

**Technická univerzita v Liberci**

**Fakulta textilní**

Obor: 3106 – T – 002 Chemická technologie textilní

**Variabilita účinku enzymů na destrukci balastních  
vlněných komponent**

**Variability of enzyme effects to ballast woollen component  
destruction**

**Benaglia Gabriele**

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Irena Horská  
Konzultant: Prof. Ing. Jiří Kryštůfek Csc.

**Rozsah práce a příloh:**

Počet stran: 78

Počet tabulek: 15

Počet obrázků: 34

Počet příloh: 1

## ***Anotace:***

Cílem této diplomové práce bylo dokázat, že enzymy, které se tisíciletí neustále vyvíjely a zdokonalovaly, lze využít i v textilním průmyslu pro zušlechtnění řady přírodních i syntetických materiálů, v mém případě vlny. Důraz byl kladen na zkoumání, zda tyto biologické katalyzátory jsou účinné při úpravě vlněných vláken, tak aby vyhověly dnešním zpracovatelským požadavkům nejen z ekologického hlediska, ale také z hlediska mechanických vlastností, omaku a ekonomiky. Jelikož v současnosti se o této metodě veřejně nediskutuje, čtenář má k dispozici první konkrétní výsledky, které vyzdvihují enzymy nad klasickými, neekologickými a drastickými zušlechťovacími metodami.

## ***Annotation:***

The goal of this thesis was to prove that enzymes, which have been developed and improved for millennia, can be used in textile industry for improvement of range of both natural and synthetic materials, in my case – wool. The emphasis was laid on the research of effectiveness of these biological catalyzers for forming wool fobers in a way to satisfy contemporary manufacturing requirements taking into account not only economic and environmental aspects but also aspects of mechanical qualities and hand feel. Since this method has not been publicly discussed lately, the readers have at their disposal first concrete results which prefer enzymes to traditional, environmentally unfriendly and drastic improvement methods.

## ***Premessa:***

L'obbiettivo che si prefisse questa tesi di laurea fu quello di dimostrare, che gli enzimi, da millenni in continua evoluzione e perfezionamento, si possano utilizzare nell'industria tessile per la nobilitazione di un vasto gruppo di materiali sia naturali, sia sintetici. Nel mio caso trattasi di lana. L'accento venne posto nel ricercare e nel dimostrare il rendimento di questi catalizzatori biologici nel finissaggio di fibre laniere, non solo per venire in contro alle richieste degli industriali riguardo ai parametri ecologici ed economici, ma anche per quanto concerne le proprietà meccaniche delle fibre così trattate. In questo elaborato il lettore ha a disposizione una serie di risultati concreti, fino ad ora non pubblicati, che mettono in risalto il finissaggio enzimatico rispetto alle classiche tecnologie di finissaggio chimico, inquinanti e drastiche.

### ***Místopřísežné prohlášení***

Místopřísežně prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury.

V Liberci dne 03. 04. 2005

.....

## ***Poděkování***

*Rád bych touto cestou poděkoval všem, kteří mi svými radami a připomínkami pomohli k dokončení této diplomové práce.*

*Děkuji především Mgr. Ireně Horské a Dr. Horskému za odborné vedení a za pomoc při řešení problémů, které se při měření či zpracovávání této diplomové práce vyskytly. Také děkuji Ing. Vladimírovi Kovačičovi za spolupráci a Prof. Jiřímu Kryštůfkovi za cenné rady při zahájení diplomové práce.*

*Dále bych velmi rád poděkoval svým rodičům a známým, kteří mi byli po celou dobu mého studia oporou a v neposlední řadě mé babičce za odbornou gramatickou cenzuru.*

## *Seznam použitých zkratek*

aj.	.....a jiné
apod.	.....a podobně
atd.	.....a tak dále
C	.....uhlík
ČSN	.....Česká Státní Norma
DMF	.....dimethyl formamid
EC	.....enzymová komise
el.	.....elektrický
enzym.	.....enzymatická
F	.....fluor
fy	.....firma
ISO	.....International Standards Organization
IUB	..... Mezinárodní Unie Biochemie
kap.	.....kapitola
konc.	.....koncentrace
konst.	.....konstanta
KTM	.....Katedra textilních materiálů
M	.....muž
N	.....dusík
např.	.....například
O	.....kyslík
obr.	.....obrázek
PC	.....personal computer
popř.	.....popřípadě
resp.	.....respektive
RH	.....relativní vlhkost
str.	.....stránka
tj.	.....to jest
TUL	.....Technická Univerzita v Liberci
tzn.	.....to znamená
tzv.	.....tak zvaný

vl.mat. ....vlněný materiál

Ž .....žena

### ***Seznam použitých fyzikálních veličin***

$\text{cm}^{-1}$  .....vlnčet

g .....gram

kJ .....kilojoule

l .....litr

$\text{m}^3$  .....metr krychlový

min .....minuty

N ..... Newton

nm .....nanometry

Pa ..... Pascal

sec .....sekunda

tex .....jemnost vláken

$\mu\text{m}$  .....mikrometry

# Obsah

<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>3</b>
<b>1 VLASTNOSTI VLNY .....</b>	<b>3</b>
1.1 MORFOLOGIE: .....	3
1.1.1 Kutikula.....	4
1.1.2 Cortex.....	5
1.2 CHEMICKÁ STRUKTURA VLNY A JEJÍ VLASTNOSTI. ....	5
1.2.1 Aminokyseliny: základní stavební kámen všech bílkovin.....	5
1.2.2 Nejdůležitější vlastnosti $\alpha$ -aminokyselin .....	7
1.2.3 Konstituce keratinu .....	12
1.2.4 Chemické vlastnosti bílkoviny keratinu. ....	16
1.3 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI.....	18
1.3.1 Pracovní diagram .....	18
1.3.1.1 Pracovní diagram vlněného vlákna.....	20
<b>2 ZUŠLECHŤOVACÍ PROCESY .....</b>	<b>22</b>
2.1 PŘEDÚPRAVA VLNY .....	22
2.1.1 Chlorování .....	23
2.1.2 Oxidační metody .....	24
2.1.3 I.F.P (InterFacial Polymerisation).....	25
2.1.4 Maskování s preformovanými pryskyřicemi .....	25
2.1.5 Kombinovaná úprava (Chlorování/maskování).....	25
2.1.6 Enzymatická úprava vlny.....	26
2.1.6.1 Použití papainu .....	26
2.1.6.2 Použití trypsinu .....	26
2.1.6.3 Použití bakterie <i>Streptomyces fradiae</i> (SFP) .....	27
2.1.6.4 Enzymatická úprava provedená podle CNR – ISMAC. ....	30
<b>3 ENZYMY: NEJROZMANITĚJŠÍ BIOLOGICKÉ KATALYZÁTORY .....</b>	<b>31</b>
3.1 KLASIFIKACE ENZYMŮ .....	32
3.2 KONFORMAČNÍ STRUKTURA PROTEINŮ .....	33
3.3 MECHANISMUS ENZYMATICKÉ KATALÝZY .....	34

3.4	ENZYMY POUŽÍVANÉ NA VLNĚNÉ VLÁKNO. CHEMICKÁ STRUKTURA	
	CHARAKTERISTICKÉ VLASTNOSTI.....	36
3.4.1	$\alpha$ - chymotrypsin.....	37
3.4.2	Trypsin.....	39
3.4.3	<i>Aspergillus saitoi</i> ( <i>Aspergillus phoenicis</i> ).....	40
3.4.4	Papain ( <i>Carica Papaya</i> ).....	40
3.4.5	Bromelain.....	41
4	.STATISTICKÉ METODY PRO ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ MĚŘENÍ... 41	
	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>43</b>
5	ENZYMATICKÁ ÚPRAVA VLNĚNÉHO VLÁKNA .....	43
5.1	STANOVENÍ ÚBYTKU HMOTNOSTI VLÁKEN.....	43
5.2	ZKOUŠKA PEVNOSTI A TAŽNOSTI VLNĚNÝCH VLÁKEN PO ENZYMATICKÉ ÚPRAVĚ	45
5.3	TENKOVŘSTEVNÁ CHROMATOGRRAFIE .....	51
5.4	CHROMATOGRAMY.....	52
6	KOMBINACE VÍCE ENZYMU .....	55
7	STANOVENÍ OBSAHU CYSTEINU (CYSTINU) A DALŠÍCH	
	AMINOKYSELIN .....	60
7.1	IR SPEKTROSKOPIE .....	60
7.2	SPECIFICKÉ PÍKY PRO IDENTIFIKACE AMINOKYSELIN .....	61
7.3	PŘÍPRAVA VZORKŮ A JEJÍCH ANALÝZA.....	62
7.3.1	Stanovení obsahu cystinu (cysteinu). .....	63
7.4	STUDIUM OMAKU.....	67
8	ZÁVĚR .....	74
	<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>77</b>



## Úvod

*Felix qui potuit rerum cognoscere causas*

*(Georg. II, 490)*

Člověk jakožto tvor zvědavý, tvořivý, Bohu oddaný, pociťuje potřebu stále něco nového objevovat nebo zdokonalovat. Bez výjimek to platí i pro zušlechťování textilií.

Na přelomu XIX a XX století, za pomoci odborné znalosti z chemie, se začaly vyvíjet nové metody pro vylepšení vlastností různých textilních materiálů a to hlavně přírodních vláken, zejména bavlny, vlny a přírodního hedvábí.

Již v roce 1839 *J. Mercer* pozoroval, že zpracujeme-li vlnu ve chlorové lázni, ono vlákno bude mít větší afinitu k barvivům. Avšak neuvědomil si, že chlorováním se zmenší plstivost mezi vlákny, zvýší se bobtnavost a smáčivost. Snížení plstivosti se vysvětluje tím, že vnější vrstva šupinek (epikutikula) se více či méně poruší a tím dochází ke snížení tření mezi vlákny. Na *Mercerovy* poznatky v roce 1865 p. *Lighfoot* zavedl chlorování vlny jako proces do tiskařského průmyslu.

Pouze v roce 1899 p. *Stenfield* uvádí jako první chlorování za účelem neplstivé (nesráživé) úpravy. Vývoj v tomto směru pokračoval. Mnoho badatelů objevilo spoustu nevýhod, které s tímto procesem souvisí. Hlavní nevýhodou tohoto procesu je nestejněměrná adsorpce chlóru do vlněných vláken a zároveň jejich následnému poškození.

Na tomto faktu byly vyvíjeny nové technologické postupy, které měly zmenšit nebo totálně odstranit předem zmíněné problémy. Před druhou světovou válkou se zkoušelo chlorovat za sucha pomocí organických rozpouštědel a vyvinuly se různé retardéry, které regulovaly adsorpci chlóru. Zkoušely se také jiné halogeny, např. bromová voda, nebo páry fluoru. Aplikovala se pak různá redukovadla a oxidovadla, která měla částečně narušit strukturu keratinu (především cystinové můstky) a poprvé se objevila možnost nesráživé úpravy biochemickou cestou pomocí proteolytických enzymů.

Tato diplomová práce je zaměřena na výhody použití biochemických přírodních katalyzátorů pro neplstivou úpravu vlny. Tato metoda byla známa už na začátku XX století a nenašla uplatnění v praxi kvůli technické a ekonomické náročnosti, přesto že

vykazovala velmi dobré výsledky (homogennost úpravy a ekologickou nezávadnost). Důsledkem toho bylo zavedení postupu chlorování vlny, které je používáno do současné doby jako nejrozšířenější neplstivá úprava, dle mého názoru, na úkor životního prostředí.

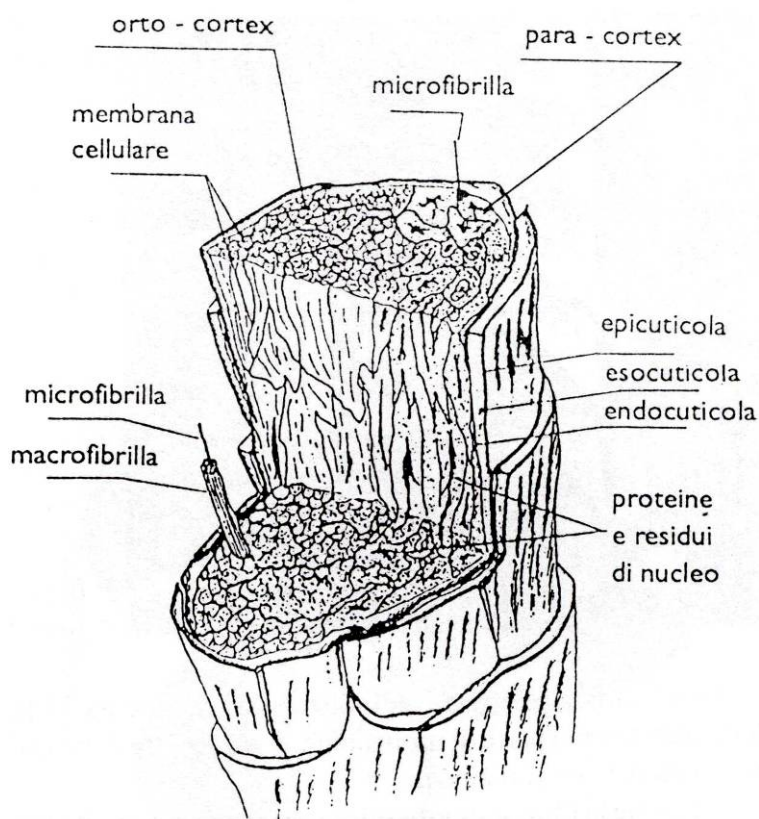
Tato diplomová práce navazuje na diplomovou práci Ing. J. Čínatlové s názvem: „*Možnosti enzymatického zušlechťování vlny*“ (Technická univerzita v Liberci 2004) [1].

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 Vlastnosti vlny

### 1.1 Morfologie:

Vlněné vlákno přírodního původu (ovce, koza, lama, králíčí srst, velbloudí aj.), má velmi komplexní morfologickou strukturu. Nejdůležitější části pro textilního chemika jsou především **kutikula** a **cortex**. Na následujícím obrázku je znázorněna morfologická struktura vlny *obr. 1*.



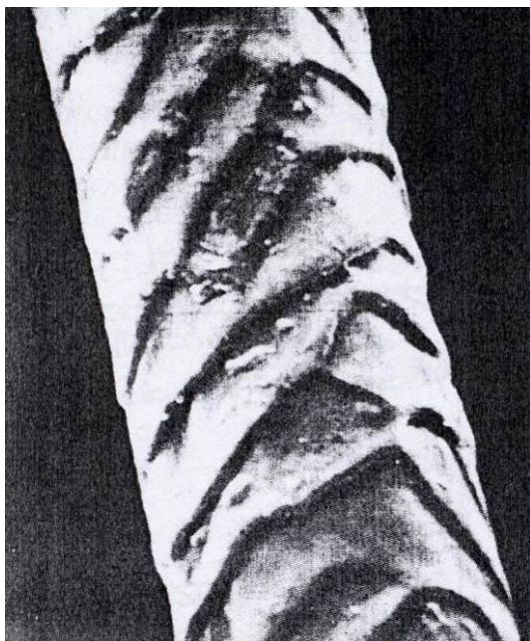
Obr.1. Morfologie vlněného vlákna.

V následujících podkapitolách bude velmi stručně rozebrána jak kutikula, tak i cortex (orto a para).

### 1.1.1 Kutikula

Je to membrána o průměrné tloušťce 0,7  $\mu\text{m}$ , která objímá vlněné vlákno a dodává mu důležité vlastnosti jako jsou **hydrofobnost** a **povrchové tření**.

**Hydrofobnost** je hodně závislá na chemickém složení kutikuly. Je dobře známo, že externí část kutikuly, *epikutikula*, je zastoupená ve velkém množství lysinem (obsahuje  $\text{NH}_2$  skupiny), jeho tloušťka je zhruba v rozmezí 5 – 10 nm a je zcela hydrofobní a inertní vůči chemikáliím (důkaz Alwördenovou reakcí). Hlavní část šupinek tvoří *esokutikula* o tloušťce cca 0,15 nm, která obsahuje značné množství cystinu, jeden S – S můstek na 5 aminokyselin (odkaz na *kap.1.2.3. str.14.*). Tyto vazby se dají lehce narušit oxidačním procesem (vítr, déšť, UV záření apod.) a tudíž mohou zapříčinit nehomogenní difúzi tekutého média do vnitra vlákna (např. barvivo). Tento problém je známý pod názvem špičkovitost. Poslední vrstva kutikuly je tvořená *endokutikulou*, která naopak obsahuje malé množství cystinu a je odolná vůči mechanickému namáhání a je chemicky inertní. **Povrchové tření** ovlivňuje řadu vlastností vlněného produktu a to hlavně omak. Je způsobeno třením mezi jednotlivými vlákny s externími tělesy, jako např. válce při protahování před předením. Tato vlastnost je závislá na geometrickém uspořádání kutikuly, která je podél celého vlákna, od kořínku až ke špičce, ve tvaru **šupinek** (znázorněno na *obr. 2.*).



Obr.2. Kutikula a její šupinkovitý tvar.

Geometrie vlákna ovlivňuje jak předúpravu, tak i finální úpravu vlněného materiálu, poněvadž splňuje potřebné podmínky, aby nastal jev známý - **plstivost**.

Plstivost může být definována jako progresivní proces zaplétání vláken vlivem vnějších sil do nespřádatelného chuchvalce. Zde se šupinky mezi sebou zakotví tak, že nelze pak jednotlivá vlákna oddělit. Tyto síly musí mít určitý směr, od špičky ke kořínku. Rozdíl mezi těmito silami v obou směrech je popsán pomocí tzv. DFE (differential friction

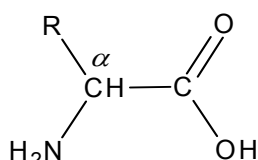
effect), v překladu „rozdílné efekty tření“. Jeho hodnoty nám umožňují říci, zda vlněný materiál je nebo není schopen se plstít [2,5].

### 1.1.2 Cortex

Zastupuje z 70 - 90% celé hmoty vlněná vlákna a tudíž zodpovídá za jeho veškeré chemické a fyzikální vlastnosti. Nejdůležitější charakteristikou cortexu je jeho multistrukturální složení. De facto máme ortocortex a paracortex, které mají odlišné chemické vlastnosti. Ortocortex např. vzhledem k větší amorfítě je lépe probarvitelný. Z praktického hlediska je velmi důležité geometrické uspořádání těchto dvou komponentů. Vůči sobě mohou být asymetrické a dodávají vláknům značnou kadeřavost. Toto je typické pro vlny druhu Merinos a obecněji pro velmi jemné vlny. Pak máme symetrické uspořádání, kde ortocortex tvořící jádro vlákna je obklopen paracortexem (obecné vlny). V poslední řadě existují vlny, kde totálně chybí jeden z předem zmíněných komponentů. Např. vlna ovce Blackface obsahuje pouze paracortex, druh Mohair ortocortex. Tyto vlny jsou velmi hebké a hladké [2].

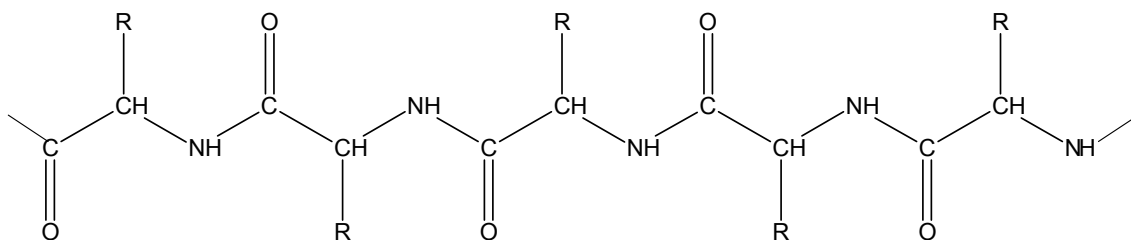
## 1.2 Chemická struktura vlny a její vlastnosti.

### 1.2.1 Aminokyseliny: základní stavební kámen všech bílkovin.



Vlna jako živočišné vlákno je tvořena **keratinovým proteinem**. Keratin je bílkovina, skládající se z kombinaci 18 aminokyselin (molekuly organického charakteru, které obsahují dvě funkční skupiny: karboxylovou a aminovou). Obecná struktura je vlevo znázorněna. Skupina –R, která je vázaná na uhlík alfa, definuje povahu dané aminokyseliny.

V proteinech se jednotlivé aminokyseliny kombinují kondenzací, reakcí mezi karboxylovou (kyselá skupina) a aminovou skupinou (bazická skupina) za odjímání jedné molekuly vody. Výsledkem této reakce je vytvoření **peptidové vazby** - CO-NH - za vzniku dlouhého polypeptidického řetězce.

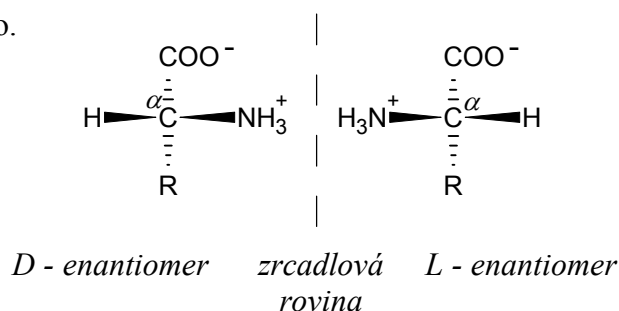


Ke klasifikaci aminokyselin nám napomáhají předem zmíněné skupiny  $-R$ , na kterých závisí veškeré chemické a fyzikální vlastnosti makromolekul tvořící vlněná vlákna.

Na str. 6 je uveden *graf 1.*, kde jsou znázorněna procenta zastoupení jednotlivých aminokyselin v makromolekule keratinu. Zvláštní pozornost je dána na ty postranní řetězce, které obsahují kyselé skupiny (kyselina asparagová), bazické skupiny (lysin) a hlavně **cystin**, tj. aminokyselinu, která je příčinou disulfidických můstků mezi dvěma polypeptidickými řetězci [2].

Nechme na chvíli keratin a vraťme se k podrobné klasifikaci aminokyselin. V přírodě můžeme nalézt 20 kódovaných aminokyselin. Jejich názvy jsou odvozené od triviálních názvů končících na *-in*. Ke zkrácenému zápisu užíváme třípísmenné symboly, které tvoří většinou první tři písmena triviálního názvu (*tab. 1*).

S výjimkou glycinu mají ostatní aminokyseliny asymetrický atom uhlíku ( $C_\alpha$ ), jinak řečeno chirální uhlík. Existují proto ve dvou enantiomerních konfiguracích, jak je zde níže znázorněno.



V proteinech se vyskytují pouze L-formy, ale existují i D-formy, které jsou využívány některými mikroorganismy k vytvoření peptidů, jež jsou pro jiné organismy vysoce toxickými látkami (např. antibiotika). V další podkapitole bude pojednáno o rozmanitých vlastnostech  $\alpha$ -aminokyselin [3,4].

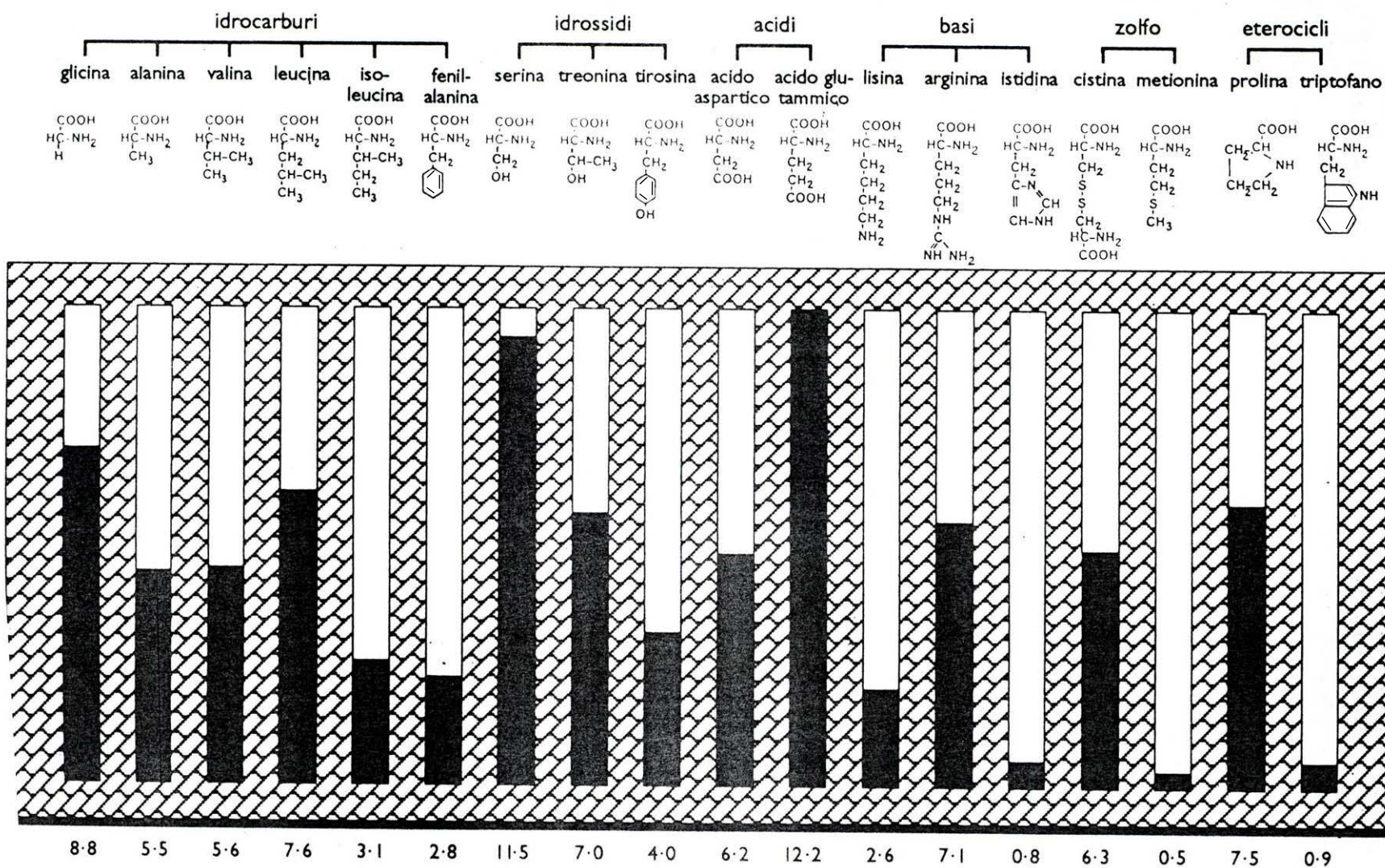
### **1.2.2 Nejdůležitější vlastnosti $\alpha$ -aminokyselin**

Při dlouhodobém studiu proteinů se zjistilo, že nejdůležitějšími vlastnostmi jsou: polarita, acidobazické vlastnosti, optické a biochemické vlastnosti. Chemické reakce budou citovány a rozebrány v následující podkapitole.

#### **Polarita**

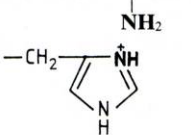
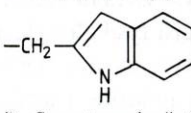
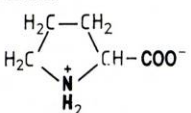
Polovina kódovaných aminokyselin je zcela hydrofóbní, resp. nepolární. Tato nepolarita je dána postranním řetězcem. Znamená to, že tato skupina aminokyselin (např. valin, isoleucin, prolin, tryptofan, fenyalanin aj.) se uplatňuje při hydrofobních interakcích. Ostatní aminokyseliny lze rozdělit do dvou skupin. Na ty, které jsou zcela polární - v neutrálním prostředí postranní řetězec má elektrický náboj a ty, které v předem zmíněném prostředí nemají v postranním řetězci el. náboj. První skupina (serin, threonin, asparagin, tyrosin, glutamin) bude příčinou vzniku vodíkových můstků a druhá skupina (kyseliná asparagová, glutamová, histidin, lysin a arginin) se bude podílet na elektrostatické interakci.





Graf.1 – Zastoupení aminokyselin ve vlněném vlákne v procentech.

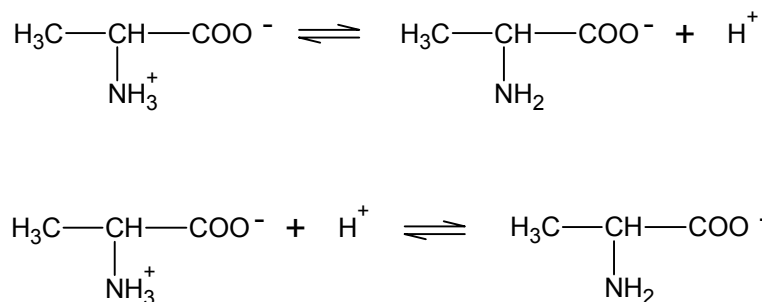


®	Triviální název	Symbody	Rel. mol. hmotnost zbytku při pH 7,0	Kys. disoc. konst. <sup>1)</sup> pK (25 °C)	Isoelektr. bod pI	Relativní výskyt v bílkovinách <i>E. coli</i> (%)
a)	Bez postranního řetězce					
	—H glycín	Gly, G	57	2,34; 9,60	5,97	7,8
b)	S uhlovodíkovým nesubstituovaným řetězcem					
	—CH <sub>3</sub> alanin	Ala, A	71	2,34; 9,69	6,01	13
	—CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> valin	Val, V	99	2,32; 9,62	5,97	6,0
	—CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> leucin	Leu, L	113	2,36; 9,60	5,98	7,8
	—CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> isoleucin	Ile, I	113	2,26; 9,62	5,94	4,4
c)	S hydroxylem v postranním řetězci					
	—CH <sub>2</sub> OH serin	Ser, S	87	2,21; 9,15	5,68	6,0
	—CH(OH)CH <sub>3</sub> threonin	Thr, T	101	2,15; 9,12	5,64	4,6
d)	Se sirnou skupinou v postranním řetězci					
	—CH <sub>2</sub> SH cystein	Cys, C	103	1,71; 8,33 (SH); 10,78	5,02	1,8
	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub> methionin	Met, M	131	2,28; 9,21	5,74	3,8
e)	S karboxylem v postranním řetězci					
	—CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> asparagová kyselina	Asp, D	114	2,09; 3,86(β COOH); 9,82	2,98	9,9 <sup>3)</sup>
	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> glutamová kyselina	Glu, E	128	2,19; 4,25(γ COOH); 9,67	3,22	10,8 <sup>3)</sup>
f)	S karboxamidovou skupinou v postranním řetězci					
	—CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> asparagin	Asn, N	114	2,02; 8,80	5,41	—
	—CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> glutamin	Gln, Q	128	2,17; 9,13	5,65	—
g)	S postranním řetězcem s basicou skupinou					
	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> lysin	Lys, K	129	2,20; 8,90; 10,28(ε-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	9,59	7,0
	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NHC(=NH <sub>2</sub> ) <sup>+</sup> arginin	Arg, R	157	2,17; 9,04; 12,48(Gua <sup>+</sup> )	10,76	5,3
	 histidin <sup>2)</sup>	His, H	137	1,82; 6,0(Im <sup>+</sup> ); 9,17	7,59	0,7
h)	S aromatickým postranním řetězcem					
	—CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> fenylalanin	Phe, F	147	1,83; 9,13	5,48	3,3
	—CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OH(p) tyrosin	Tyr, Y	163	2,20; 10,07(OH); 9,11	5,66	2,2
	 tryptofan	Trp, W	186	2,38; 9,39	5,89	1,0
i)	S postranním řetězcem jako součástí kruhu					
	 prolin	Pro, P	97	1,99; 10,60	6,40	4,6

Tab.1. – struktura, názvy, symbody a acidobasické vlastnosti kódovaných aminokyselin. Polární části jsou vyznačené polotučně.

**Acidobasické vlastnosti**

Jak je dobře známo, aminokyseliny jsou zařazené do skupiny látek, které projevují amfoterní charakter, a proto se také nazývají **amfolyty**.



První reakce poukazuje na kyselé chování aminokyselin, druhá reakce se jeví jako zásaditá. Při určitém pH se v roztoku nachází v převážní míře neutrální forma aminokyseliny, kdežto kationtová a aniontová forma se vyskytuje pouze ve stopovém množství. Tuto hodnotu označujeme jako – **isoelektrický bod  $pI$** , tj. hodnotu, při které amfolyt je ve formě **amfoiontů**. Znamená to, že výsledný náboj je nulový a tudíž v elektrickém poli nebude zaznamenáno žádné putování. Tuto důležitou charakteristiku lze matematicky odvodit dle následujícího vztahu:

$$pI = \frac{1}{2} \cdot (pK_1 + pK_2) \quad (1.2.2.1)$$

kde  $K_1$  a  $K_2$  jsou tzv. kyselé disociační konstanty, které vyjadřují tendenci skupiny odštěpovat proton. Tyto hodnoty se vztahují na amfolyty přijímající proton při snižování hodnoty pH pod isoelektrickým bodem a odštěpují proton při zvyšování pH nad  $pI$ .

Při změně **pH** se mění i **stupeň disociace** aminoskupin a karboxylových skupin a tedy i charakter aminokyselin. Neutrální aminokyseliny, které v postranním řetězci neobsahují žádné skupiny (mohly by reagovat s protonem), mají isoelektrický bod  $pI$  mezi 4,8-6,3. Výjimkou jsou kyseliny glutamová a asparagová, které mají hodnotu isoelektrického bodu okolo  $pI$  1,98-3,08 a bazické aminokyseliny histidin, arginin, lysin, kde  $pI$  je okolo 9,47 až 10,76.

Když vše shrneme, tak můžeme říci, že aminokyseliny díky svému bipolárnímu charakteru se chovají spíše jako soli než klasické organické látky. Pro informaci její bod tání se pohybuje okolo 200 až 350 °C a jsou velmi dobře rozpustné ve vodě (pokud jsou ve formě soli). Tato charakteristika, jak předem zmíněno, závisí na hodnotě pH roztoku a v isoelektrickém bodě je nejnižší.

## **Biochemické vlastnosti $\alpha$ -aminokyselin**

Jak již bylo předem zmíněno, každá aminokyselina má odlišné vlastnosti, které se dají přičíst postrannímu řetězci. V následujících řádcích budou stručně popsány nejdůležitější charakteristiky 20-ti kódovaných aminokyselin.

*Glycin*: nemá postranní řetězec a tudíž z hlediska isomerie zaujímá nejmenší prostor ze všech aminokyselin. Je zastoupen ve velkém množství v složitých proteinech (kolagen, hedvábí, vlna apod.).

*Alanin, valin, leucin, isoleucin*: zde postranní řetězec tvoří alifatické skupiny, tudíž lze předpokládat značnou hydrofobnost, která je důležitá pro stejnojmenné hydrofobní interakce.

*Serin*: obsahuje hydroxymethylovou skupinu ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), která nedisociuje za fyziologických podmínek, ale je velmi důležitá pro vytvoření vodíkových můstků. V řadách reakcí se tato hydroxylová skupina chová jako nukleofil.

*Cystein*: thiolová skupina ( $-\text{SH}$ ) postranního řetězce dodává značnou kyselost. Vzhledem k velké reaktivitě, resp. nukleofilnosti atomu síry, se tato aminokyselina uplatňuje v řadách biochemických a enzymových reakcí. Nejdůležitější vlastností je, že tato thiolová skupina je snadno oxidovatelná. Znamená to, že vše vede k vytvoření cystinových můstků (příčné vazby mezi dvěma atomy síry). Tyto můstky kovalentního charakteru v peptidovém řetězci mohou být intramolekulární (v totožném řetězci) nebo intermolekulární (mezi dvěma řetězci). V následujících kapitolách bude o těchto vazbách velmi podrobně pojednáno.

*Methionin*: je to druhá sirná aminokyselina, která se uplatňuje především v nukleofilních reakcích. Je méně polarizovatelná než thiolová.

*Fenylalanin, tryptofan*: jsou to aromatické aminokyseliny a jako alifatické aminokyseliny slouží, díky své hydrofobnosti, k vybudování nitra proteinů.

*Tyrosin*: díky své fenolové skupině ( $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) patří do skupiny aromatických aminokyselin. Dokáže odštěpovat proton při  $\text{pH}=10$  a tudíž se velmi dobře uplatňuje při tvorbě vodíkových vazeb. Mimo toho se zde uplatňují také tzv.  $\pi - \pi$  interakce, které se vytvářejí mezi aromatickými kruhy a nazývají se také *stacking* (patrové). V neposlední řadě lze dodat, že tyto aromatické skupiny v aminokyselinách se dobře detekují na spektrofotometrech, poněvadž absorbují v ultrafialových oblastech mezi 260 až 300 nm.

*Kyselina asparagová a glutamová*: při fyziologickém pH mají záporný náboj a proto jsou významné při tvorbě prostorových bílkovin. V živých organismech slouží k přenosu mezi nervovými buňkami.

*Arginin*: velmi silná organická báze, kterou lze srovnat s hydroxidem sodným.

*Lysin*: obsahuje v postranním řetězci velmi reaktivní aminoskupinu a proto se účastní v řadách proteinových reakcí.


*Histidin*: za  $\text{pH}=5,5$ , (čili fyziologický  $\text{pH}$ ) je v amfolytického stavu a tudíž může přijímat nebo poskytovat proton jiným látkám. K tomu imidazolový kruh je výborným nukleofilem a tvoří katalytické skupiny v aktivních centrech enzymů.

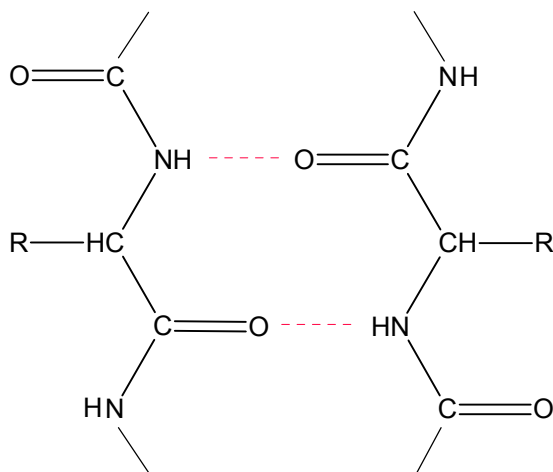
*Prolin*: díky své struktuře (viz. tab.1.) je příčinou změny směru polypeptidového řetězce a tudíž hraje nezbytnou roli při formování prostorových struktur proteinů.

Na chemické reakce aminokyselin, především na jejich výrobu a na syntézu peptidů, se odkáže na **kap.3** o enzymech. V následujících podkapitolách budou stručně rozebrané chemické a fyzikální vlastnosti peptidů keratinu [4].

### **1.2.3 Konstituce keratinu**

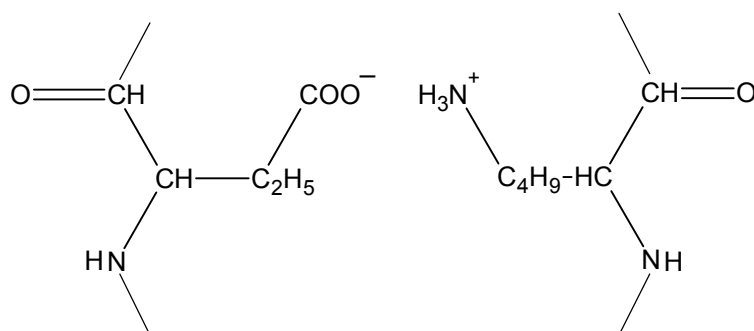
Jak je citováno v podkapitole **1.2.1**, polypeptidové řetězce tvořící keratin jsou budované kondensací více  $\alpha$ -aminokyselin. Tyto dlouhé makromolekuly mezi sebou jsou vázány několika vazbami. Mezi nejdůležitější patří:

 **vodíkové vazby**. Je – li atom vodíku vázán na silně elektronegativní atom kyslíku nebo dusíku (popř. fluoru) dojde k polarizaci této vazby, to znamená k posunu elektronů ve prospěch elektronegativnějšímu atomu a vede k vytvoření silného dipólu. Vznikají parciální náboje, kladný na vodík a záporný na kyslík nebo dusík. Tím se sníží odpudivost elektronového obalu atomu vodíku a umožní se přiblížení dalšího atomu (F,O,N). Vazebná energie této vazby činí 17 kJ/mol. Když uvažujeme, že kovalentní vazba je cca 24-krát silnější, plyne z toho, že vodíková vazba nebo-li také vodíkový můstek je velmi slabou vazbou, kterou lze snadno štěpit (např. vodou). Na druhou stranu tyto vazby jsou velmi důležité pro stabilizaci celkové struktury (*settings*) a jsou využívány v různých předúpravenských technologiích.



Obr.3. - Vodíkové můstky

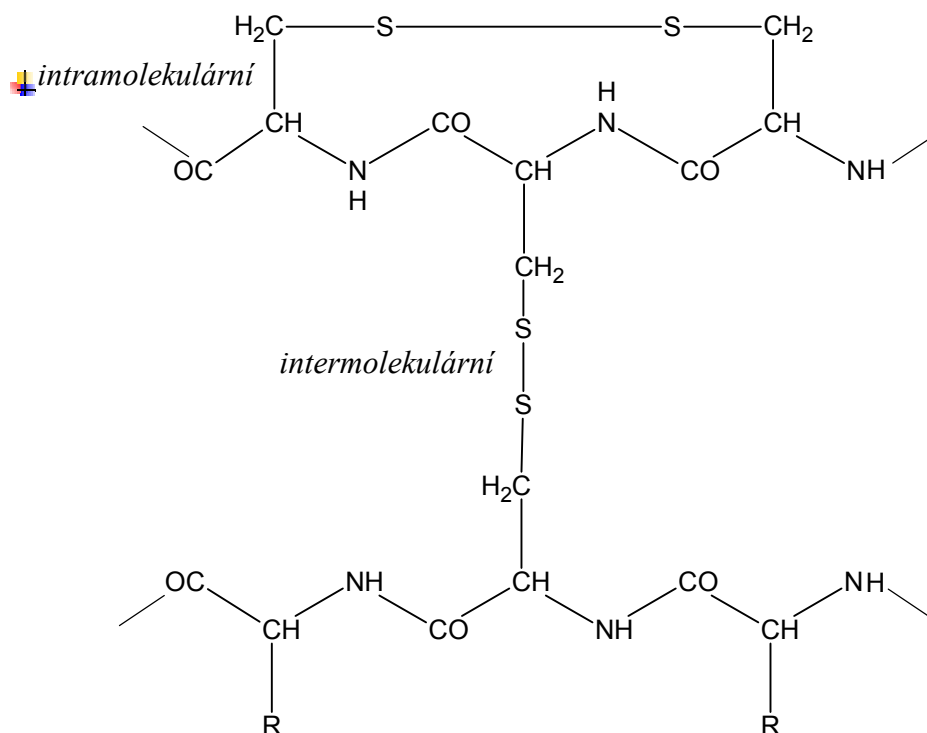
✚ **solné můstky**: tvoří se mezi aminokyselinami, které v postranním řetězci  $-R$  mají volný kyselý radikál, jako např. kyselina glutamová a volný bazický radikál (např. lysin). Jedná se o elektrostatické interakce mezi ionty a vazebná energie této vazby činí 21 kJ/mol.



Obr.4 - Solné můstky.

✚ **hydrofobní interakce** projevují se ve vodných roztocích. Nositeli této vazby jsou nepolární části molekul, které neukazují afinitu k vodě, ale přitahují se navzájem díky disperzním silám. De facto dojde k seskupení vody tak, aby měla co nejmenší styčnou plochu k nepolárním částem makromolekuly. Zde prudce narůstá entropie a vše se uskutečňuje za snížení teploty (endotermický proces). Molekuly vody se navzájem vážou pomocí vodíkových můstků a jakoby zamrzají. Mezi hydrofobní reakce patří také  $\pi - \pi$  interakce, které se vytvářejí mezi aromatickými kruhy. Vazebná energie tohoto druhu interakce se pohybuje okolo 10 kJ/mol.

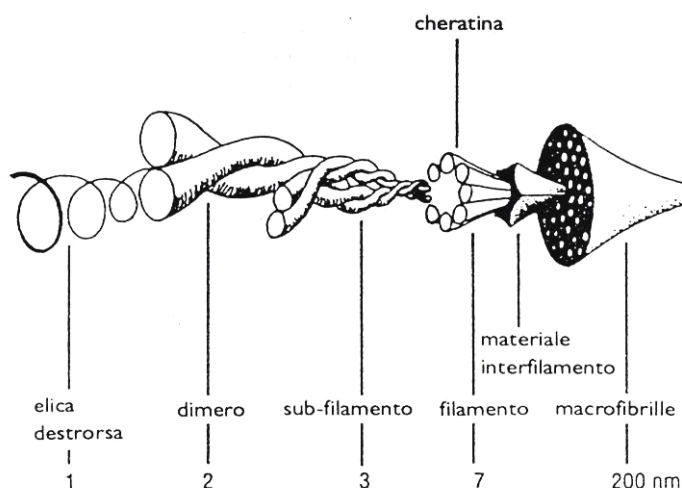
✚ **cystinové můstky**: vytvářejí se mezi řetězci, které obsahují cystein. Jedná se o kovalentní vazby a tudíž o nejsilnější vazby mezi atomy. De facto vazebná energie zde činí 400 kJ/mol. Rozlišujeme dva typy vazeb, intramolekulární vytvářející se mezi aminokyselinami v jednom řetězci a intermolekulární tvořící se mezi dvěma řetězci. Tyto vazby u keratinu, společně s velkým počtem vodíkových můstků, hrají velmi důležitou roli při stabilizaci vláken, tkaniny popř. pleteniny.



Obr.5 - Cystinové můstky.

### Stereostruktura

Keratin obsažen v cortexu vlněných vláken, je agregován do makrofibril mající krystalickou část tvořenou mikrofibrilami a amorfní část tvořenou matricí, resp. s malou a velkou koncentrací síry. Tyto fibrily, dle Zahna [2] mají helikoidální strukturu a byly potvrzeny Atsburyem v 30 letech minulého století pomocí Roentgenového záření. Zjistilo se, že polypeptidové řetězce tvořící  $\alpha$  - keratin jsou ve tvaru **pravotočivé šroubovice** (helix) a drží mezi sebou pomocí velkého množství vodíkových můstků. Je-

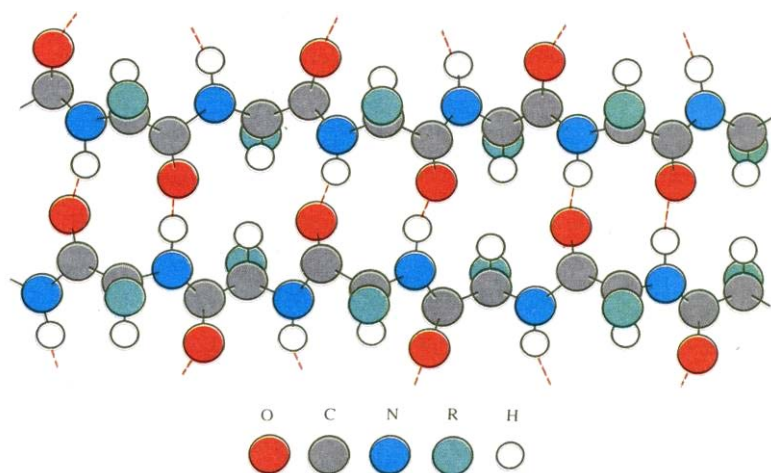
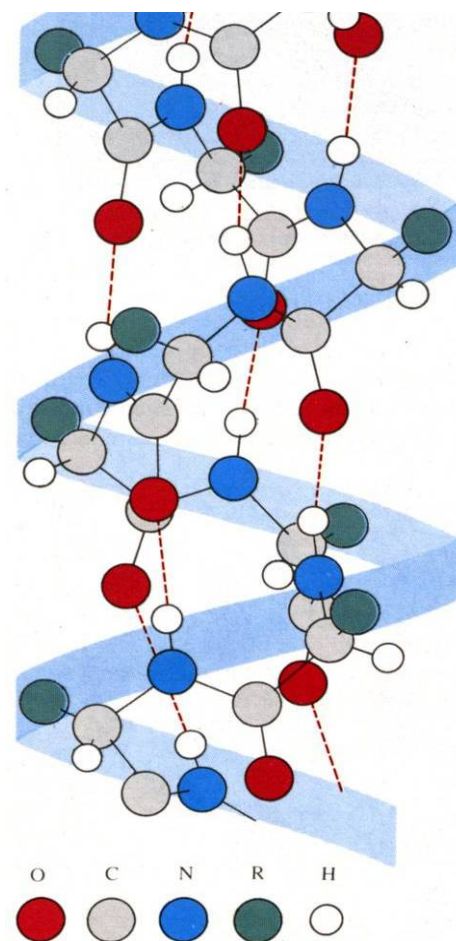


Obr.6. – Makrofibrilární struktura dle Záhna

li vlněné vlákno ponořené do vody nebo dojde-li k prudkému prodloužení, vodíkové můstky se začnou štěpit a dojde k narovnání makromolekul, které přejdou do  $\beta$ -keratinu ( $\beta$ -hřeben). Pro doplnění: tato struktura byla přijata pro znázornění fibroinu u přírodního hedvábí.

Je nutné dodat, že  $\alpha$ -keratin ve tvaru šroubovice se vytvoří je-li polypeptidový řetězec formovaný  $\alpha$ -aminokyselinami s malým nebo žádným postranním řetězcem, resp.  $\alpha$ -aminokyselinami s nízkou prostorovou izomerií (prolin, hydroxyprolin, glycin, alanin apod.).

Pro snadné pochopení dané problematiky jsou v následujících obrazech vykreslené předem zmiňované struktury. [2-5]

Obr.7. –  $\beta$ -keratin. Čárkované červené čáry značí vodíkové můstky (obrázek vlevo nahoře).Obr.8. -  $\alpha$ -keratin. Čárkované červené čáry značí vodíkové můstky. (obrázek na pravé straně).



### 1.2.4 Chemické vlastnosti bílkoviny keratinu.

Chemické vlastnosti této složité bílkoviny lze ilustrovat popsáním jejího chování v přítomnosti rozdílných chemických reaktantů, počínaje vodou a končící různými kyselinami, zásadami a solventy.

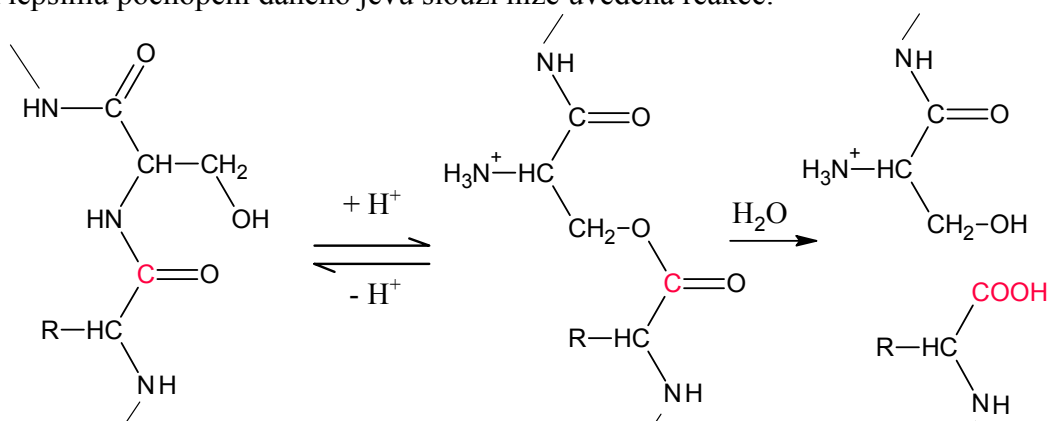
#### *H<sub>2</sub>O*

Při teplotě varu nastanou řady hydrolytických reakcí, které vedou k štěpení cystinových můstků. Lze dodat, že přesušená vlna odolá více těmto podmínkám než vlna obsahující standardní vlhkostní přírážku. Ve studené vodě nastane reversibilní štěpení vodíkových a solných můstků a to vede k nabobtnání vláken.

#### *Kyseliny*

Při pH lehce pod izoelektrickým bodem se keratin začne kombinovat s kyselinami a dojde k přerušení vodíkových a solných můstků. Postačí pouze proplach ve vodě a usušení, aby se vše vrátilo do původního stavu. Překročíme-li hodnotu pH pod 2, např. působením 30%-ní chlorovodíkové kyseliny (HCl) při teplotě varu, koncentrace protonu je tak značná, že dojde k štěpení peptidových vazeb (můstků) až k úplné degradaci makromolekuly na dipeptidy a tripeptidy.

Velmi důležitou reakcí, která se vyskytne použitím kyseliny sírové (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) při karbonizaci vlny, přičemž se odstraňují celulózové nečistoty ve tvaru řapíků, slámy apod., je reakce mezi touto kyselinou a aminokyselinami, které obsahují hydroxylové skupiny (treonin, serin). Nastane jev nazvaný „*peptidily shift*“, kde vazba N-C u peptidového můstku, která spojuje dva aminokyselinové zbytky, přejde na vazbu O-C. K lepšímu pochopení daného jevu slouží níže uvedená reakce.



Obr.9. - Kyselé hydrolyzá makromolekuly keratinu. Červený zabarvený uhlík značí místo, kde kyselý proton bude atakovat (jedná se o adici).



Jak si můžeme všimnout na obrázku, první reakce je reverzibilní, ale druhá není. To znamená, že pokud k ní dojde, tak se polypeptidický řetězec poškodí natrvalo a dojde k jeho postupné degradaci. Z tohoto důvodu, v současnosti, se tato operace (karbonizace) již neprovádí nebo značně omezuje. Zavádí se chov ovcí v čistých podmínkách tzv. *praní na místě*.

### **Alkálie**

Jak již bylo řečeno i alkálie, podobně jako kyseliny, začnou reagovat s vlnou ihned po překročení hodnoty izoelektrického bodu. V tomto případě destruktivní síla alkálii je daleko vyšší než u kyselin. Atakovány jsou aminokyseliny jako je cystein, kde disulfidické můstky se přeruší ve prospěch vzniku aminokyseliny **lanthionin** a v důsledků toho dojde k vytvoření monosulfidického můstku ( $R - S - R^1$ ). Takto vytvořená vazba je základem k některým stabilizačním úpravám (setting). Při drastických podmínkách, silný alkalický pH a teplota od 50°C a výš, začnou být atakovány i peptidické vazby a dojde k úplné degradaci vlny.

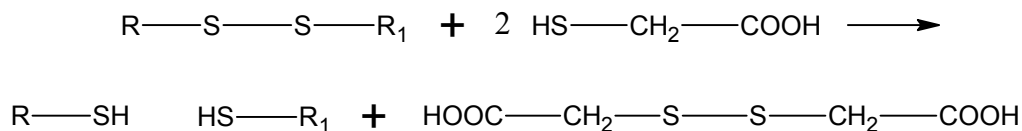
### **Oxidanty**

Běžná oxidovadla používaná v textilním průmyslu na vlněný materiál, jako je např. chlornan sodný ( $NaClO$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) aj., působí hlavně na cystinové můstky za vytvoření kyseliny cystinové. Nesmíme také zapomenout, že oxidační činidla jsou také používána jako kontrolní test na tryptofan, který velmi dobře reaguje s těmito chemikáliemi.

### **Redukční činidla**

Selektivnost redukčních činidel na disulfidický můstek je příčinou mnohých stabilizačních úprav „settings“. Nejvýznamnějšími používanými redukovadly jsou:

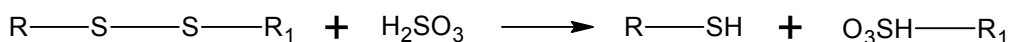
1. *kyselina thioglikolová*, která heterolyticky štěpí cystinový můstek na dva cystinové zbytky dle následující reakce:



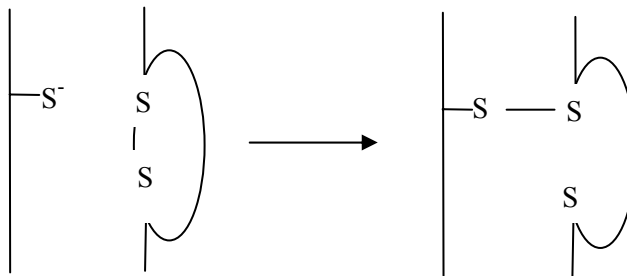
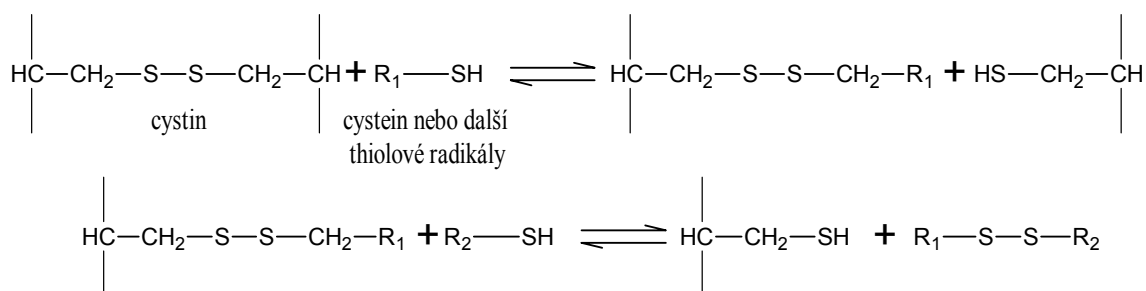
Cystinový můstek se může obnovit používáním oxidačních činidel, jako peroxid vodík aj., nebo se mohou vytvářet nové kovalentní vazby používáním organické látky s bifunkcionálními skupinami. Pro zajímavost tyto reakce jsou používané

v kosmetice pro trvalé vlasové úpravy a pro trvalou nemačkovou úpravu u vlněných kalhot.

2. *Hydrogensířičitan* (sodný nebo monoetanolaminový, MEAS) dokáže štěpit cystin v cysteinu a v kyselině cysteinsulfonové dle následující reakce:



Tato reakce je velmi důležitá z hlediska prostorové stabilizace makromolekuly keratinu, poněvadž může nastat tzv. **disulfidická výměna**. V následující reakci a obrázku lze lépe pochopit předem zmíněný jev [2]:



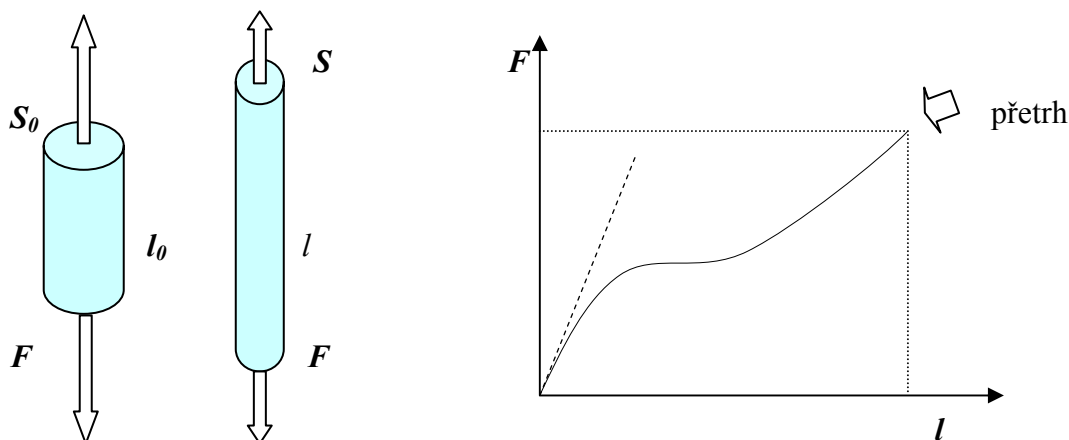
Obr.10. – Výměna thiol – disulfid mezi vazby intra a intermolekulární v peptidickém řetězci.

## 1.3 Fyzikální vlastnosti

### 1.3.1 Pracovní diagram

Základním režimem namáhání je jednoosá deformace v tahu. V tomto režimu sledujeme vztah mezi silou a protažením vláken. Působí-li na vlákno postupně rostoucí síla, dochází k růstu prodloužení až do bodu přetrhu. Charakteristikou pracovního diagramu jsou především počáteční modul  $E$  (první derivace v počátku) a souřadnice bodu přetrhu označované jako pevnost a tažnost. Jak je znázorněno na *obr. 11* vlákno o

původní délce  $l_0$  a ploše  $S_0$  působením síly  $F$  je prodloužené o délku  $l$  a zúženo o šířku  $S$ . Absolutní síla  $F$  je často nahrazená relativní silou  $F_r$  nebo-li  $\sigma$  (napětí).



Obr.11. – Jednoosé namáhání a pracovní diagram.

Vztah, který charakterizuje relativní sílu můžeme popsat následující rovnicí:

$$F_r = \frac{F}{T} = \frac{F}{S \cdot \rho} \quad [N / tex] \quad (1.3.1.1.)$$

Co se týče napětí, víme že to je síla na jednotku plochy příčného řezu tj.:

$$\sigma = \frac{F}{S} \quad [N / m^2] = [Pa] \quad (1.3.1.2)$$

Vztah mezi napětím a relativní silou lze vyjádřit dle následujícího vztahu:

$$\sigma = F_r \cdot \rho \text{ tudíž } F_r = \sigma / \rho \quad [Mpa] = [N / tex] \cdot [Kg / m^3] \quad (1.3.1.3)$$

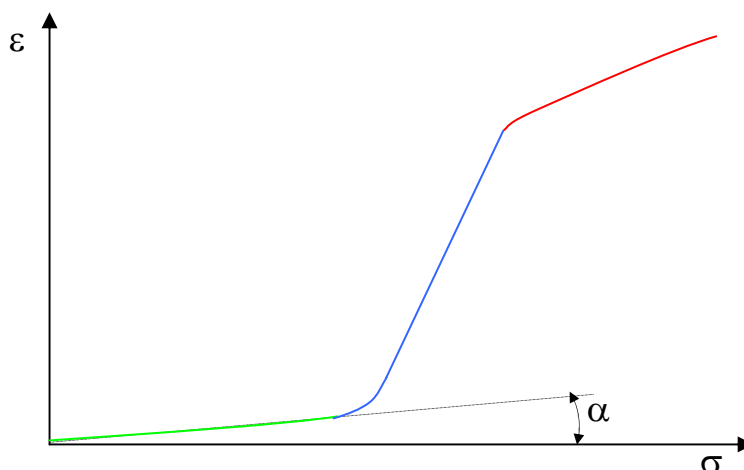
Lze také dodat, že často místo protažení  $l$  se používá deformace definovaná jako:

$$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0} \quad [-] \quad (1.3.1.4)$$

Nyní bude popsán pracovní diagram vlněného vlákna za různých klimatických podmínek [5].

### 1.3.1.1 Pracovní diagram vlněného vlákna

Pracovní diagram vlněného vlákna je charakterizován třemi velmi odlišnými částmi *obr. 12*.



Obr. 12 – Pracovní diagram vlněného vlákna.

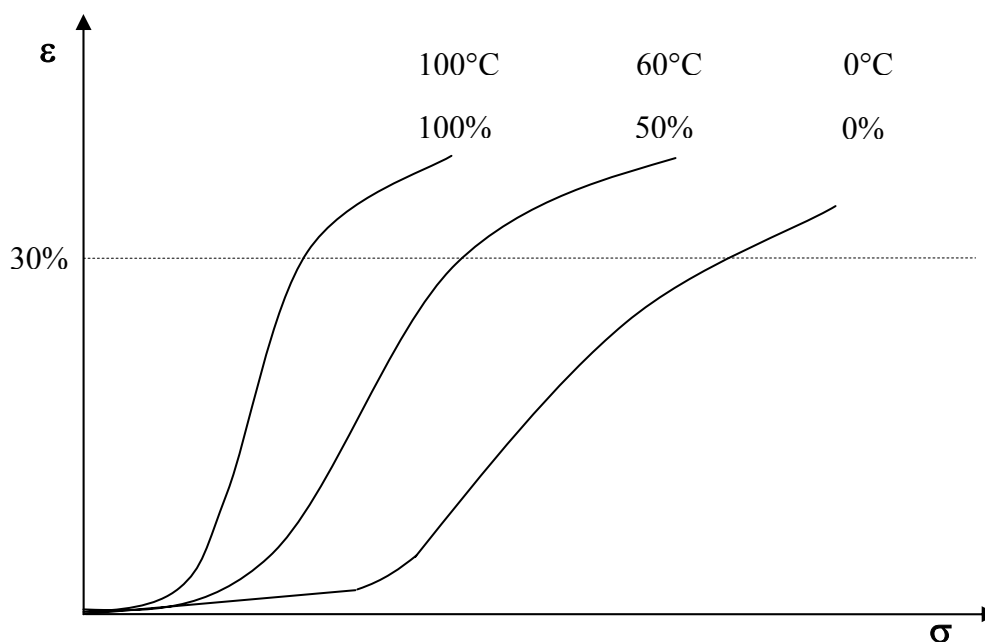
1. První zóna znázorněná v grafu zelenou barvou demonstruje přímou úměru mezi prodloužením  $\varepsilon$  a napětím  $\sigma$ . Zde platí tzv. Hookův zákon, v kterém je zahrnutý Youngův modul pružnosti  $E$  takto definovaný:

$$E = \sigma / \varepsilon \quad \text{resp.} \quad \sigma = E \cdot \varepsilon \quad (1.3.1.1.1)$$

Zde vlákno vykazuje značnou rigiditu vzhledem k početným mezi makromolekulárním silám přítomným ve vlněném vlákne.

2. Druhá zóna (modrá barva) je charakterizovaná prudkým nárůstem křivky a demonstruje, jak malé hodnoty napětí způsobují velké hodnoty prodloužení. Zde mezimolekulární vazby, především vodíkové a cystinové můstky, se naruší. De facto dojde ke změně konformaci z  $\alpha$  - keratinu na  $\beta$  - keratin.
3. Třetí a poslední zóna (červená barva) dokazuje opět velkou rigiditu vlákna (viz. první zóna) a proto při zvyšujícím se napětí je nepatrné rostoucí prodloužení až do přetrhu. V této fázi zatížení jsou namáhané kovalentní vazby mezi atomy tvořící makromolekuly vlněného vlákna a výsledkem je přetrh.

Velmi důležitá je změna pracovního diagramu při změně klimatických podmínek, především změna vlhkosti a teploty, viz. obr. 13.



Obr. 13 – Vliv teploty a vlhkosti na vlněné vlákno.

Z těchto křivek jasně plyne, že vlhkost a teplota jsou příčinou rychlejší hydrolýzy mezi makromolekulovými vazbami (vodíkové a cystinové) a tudíž umožňují přeměnu struktury z  $\alpha$  - keratinu na  $\beta$  - keratin. Do 30% - ní hodnoty prodloužení se vlákno jeví elastické a dokáže se navrátit do původního stavu. Nad tuto hodnotu, do hodnoty přetrhu, je vlákno více modelovatelné a proto tato zóna je používána pro získání trvalé stabilizační úpravy (permanent set) [2].

Obecně vzato se **pevnost** za sucha pohybuje mezi **0,9 do 1,8 cN/dtex**, za mokra se zvýší o 70 - 80%. **Hodnoty tažnosti** za sucha jsou mezi **20 - 35%** a za mokra 25% - 50% [5].

## 2 Zušlechťovací procesy

### 2.1 Předúprava vlny


Nejdůležitější procesy, patřící do kategorií předúpravy vlny, jsou takové procesy, které vedou k tzv. neplstivé neboli nesráživé úpravě.

Vlněné vlákno, jak dobře známo, má velmi rozmanité vlastnosti. Počínaje hebkostí, měkkostí, plasticity a končící izolačními schopnostmi, má také jednu vlastnost, která v mnoha případech není požadována: **plstivost** (na definici tohoto jevu se odkáže v *kap.1.1.1*).

Nesráživost vlněného zboží může být potlačena šetrným praním, ale pokud se požaduje od výrobků větší kvalita a stabilita, tak materiál musí podléhat nesráživé úpravě. Tyto úpravy mohou být rozděleny do tří kategorií:

 **Chemické úpravy** (oxidanty aj.)

 **Fyzikální úpravy** (maskování vlákna polymerním filmem)

 **Biochemické úpravy** (enzymy).


Chemické úpravy se pak mohou dále dělit na:


 *Chlorování*

 *Oxidační postupy*

Maskovací úpravy se také dělí na:

 *I.F.P (InterFacial Polymerisation)*

 *Aplikace preformovaných polymerů*

 *Kombinovaná úprava (chlorování/maskování)*

V následujících podkapitolách budou velmi stručně rozebírány každá z těchto předem citovaných úprav. Budou především zkoumány reakce s vlněným vláknem s upozorněním na jejích výhody a nevýhody.

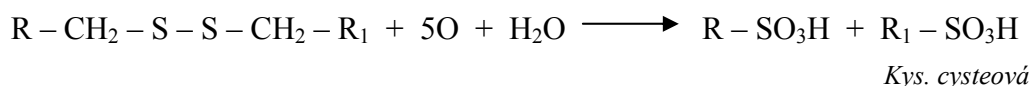
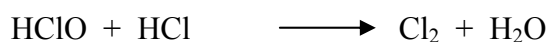
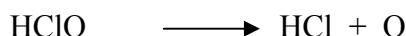
Cíl, který si klade tato práce, je dokázat, že chemické a fyzikální úpravy jsou zastaralé a nevýhodné vůči biochemickým úpravám. Ty se v budoucnosti mohou v textilním průmyslu prosadit jako nejrozšířenější nesráživé úpravy garantující jak

vysokou jakost vlněného zboží, tak i vyšší kvalitu odpadních vod. Proto této oblasti bude věnována zvláštní pozornost [6].

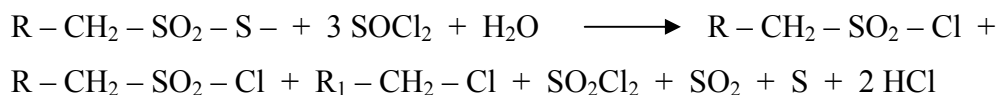
### 2.1.1 Chlorování

Snížená plstivost chlorované vlny se vysvětluje tím, že působením chloru se vnější vrstva (epikutikula) více či méně poruší. Změní se tvar šupinek, které nevykazují po této úpravě ostré hrany, ale bývají přilehlé k vláknu. Tím se sníží celková drsnost povrchu.

Při chlorování působí aktivní chlor - aktivní kyslík (viz níže uvedené reakce) na makromolekuly keratinu. De facto se předpokládá, že mohou nastat oxidativní procesy, které působí především na cystinové můstky dle následující reakce:



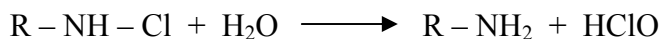
dále:



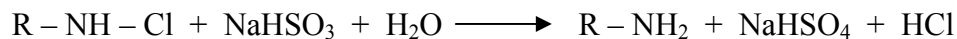
Vzniklý sulfochlorid  $\text{SO}_2\text{Cl}_2$  urychluje proces chlorování, poněvadž též atakuje cystinové můstky. Současně při této reakci dochází také ke vzniku chloraminů dle následující reakce:



Tyto chloraminy se během skladování textilií za přítomnosti vzdušné vlhkosti rozkládají. Dojde ke vzniku kyseliny chlorné ( $\text{HClO}$ ), která též podléhá samovolnému rozkladacímu procesu, při němž vzniká kyselina chlorovodíková a aktivní kyslík.



Jelikož tyto chloraminy nelze vypírat prostým praním, je nutno po chlorování provést tzv. antichlorování. Používá se disířičitan sodný ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) nebo hydrogensířičitan sodný ( $\text{NaHSO}_3$ ).



Aby chlorování jako nesráživá úprava bylo úspěšné, tak musí vlna absorbovat 0,5 – 1% akt. chloru. Překročí – li se tento interval, tak materiálu hrozí nevratné poškození. Obecně se chloruje v kyselém prostředí za pomoci kyseliny chlorovodíkové ( $\text{HCl}$ ) v konc. 6 – 8%. Chloruje se v izoelektrovém bodě, což znamená okolo pH 4 – 5.

Hlavní **výhody** této úpravy jsou: nízká provozní cena a jednoduchost celého procesu. K **nevýhodám** patří především nehomogenost úpravy. Je velmi obtížné, aby vlákno přijalo homogenně chlor a tudíž se mohou vyskytovat přechlorované (velmi poškozené) a nechlorované zóny. Další nevýhodou je neekologičnost celého procesu, který zatíží odpadní vody s drastickými následky pro životní prostředí [1,6,7].

### 2.1.2 Oxidační metody

1. IWS – 7 (England)
2. Dylan x (Precision Process textiles Ltd., England)

1.- Takto se upravují česance. Jako oxidační činidlo se používá manganistan draselný ( $\text{KMnO}_4$ ) při pH=2 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) v roztoku chloridu sodného ( $\text{NaCl}$ ). Tímto se oxidují disulfidické vazby na sulfokyseliny a získá se podobný efekt jako při chlorování.

**Výhody:** kontinuální způsob (na 5 válců), rychlost úpravy (30 sec.) a nenáročnost úpravy.

**Nevýhody:** silně kyselé pH pod izoelektrovým bodem může poškodit vlněné vlákno. Velké nároky na čištění odpadních vod.

2.- Pracuje se s kyselinou Caarovou při silně kyselém pH ( $\text{pH} < 2$ ). Po oxidaci následuje zpracování v sířičitanu. Obdrží se také mírný bělicí efekt [7].

**Výhody:** kontinuální způsob úpravy a značná rychlost procesu.

**Nevýhody:** Podobné jako u předcházející metody.



### **2.1.3 I.F.P (InterFacial Polymerisation)**

Naklocuje se vlněné zboží v lázni absorbující vodní roztok s diaminem (examethylendiamin později trimethylendiamin) a posléze se naklocované zboží nechá reagovat s kyselým dichloridem (proces Wurlon, Bancora). Reakce vede k vytvoření slabého polymerního filmu, který obklopuje povrch vlněného vlákna.

**Výhody:** jde o kontinuální proces a obdrží se velmi dobré nesráživé úpravy.

**Nevýhody:** Značně se touto metodou ovlivní počáteční omak vlněného vlákna. Ekologicky závadné [6].

### **2.1.4 Maskování s preformovanými pryskyřicemi**

Postup je velmi jednoduchý. Preformované polymery jsou rozpuštěny do patřičného rozpouštědla. Do této lázně se naklocuje vlněné zboží (synthappret LKF fy. Bayer, Braxan L fy Pfersee, Zeset TP fy Du-Pont) [6].

**Výhody a nevýhody:** stejné jako v předchozí úpravě.

### **2.1.5 Kombinovaná úprava (Chlorování/maskování)**

Používá se především pro úpravy vlněných česanců. Tato úprava je nazývána „Chlor/Hercosett 57“ by C.S.I.R.O., která je takovým kompromisem mezi chlorováním a maskováním.

Cíl je chlorovat co nejemněji, aby se příliš nepoškodilo vlákno a zvýšila se afinita k maskovacímu filmu na bázi polyamid/epichloridrin [6].

**Výhody:** jemné chlorování, nesráživost téměř dokonalá.

**Nevýhody:** ekologické náročné.

### 2.1.6 Enzymatická úprava vlny

Plstivost lze velmi kvalitně potlačit také biochemickou cestou použitím proteolytických enzymů. Vliv těchto enzymů na plstivost byl poprvé zaznamenán v 30 letech XX století v kloboučnickém průmyslu. Zde výčesky vlny byly zpracovány tzv. „potním způsobem“. Při pocení totiž určité bakterie dokážou vyprodukovat proteolytické enzymy, které podobně jako chlor vedou k nesráživosti. V těchto letech se osvědčily především **papain** a **trypsin**. V průběhu XX století se tyto metody už nerozvíjely, poněvadž se prosadilo, na úkor životního prostředí, chlorování. Pouze ke konci XX století textilní výzkum znovu objevil enzymy jako možnost neplstivé úpravy vlny. Bohužel dodnes neexistuje odborná literatura, která by prosadila výhody této úpravy a pokud něco existuje, tak je to stále dobře utajené.

#### 2.1.6.1 Použití papainu

*Papain* se získává z usušené šťávy z určitého druhu tropických stromů (Papaya – tree). Podle Middlebrocka a Phillipse, kteří jako první zkoumali tento enzym, účinnost tohoto biologického katalyzátoru závisí na několika faktorech:

1. na množství papainu (z váhy vlny)
2. na teplotě a pH lázni (60°C a pH = 6 – 7)
3. na konc. redukčního činidla (NaHS<sub>3</sub> bisulfit)\*
4. na druhu vlny (hrubá vlna)

Postup úpravy byl velmi jednoduchý a trval přibližně 10 min. Ztráta na váze vlny byla při pH 6,7 okolo 9,5%, což je přijatelná hodnota pro neplstivou úpravu.

**Výhody:** nenáročnost úpravy, dobrá neplstivá úprava, **ekologické nezávadné**.

**Nevýhody:** podle teoretických poznatků žádné.

\*POZN.: Toto činidlo je pro enzym destruktivní (způsobuje degradaci polypeptidických řetězců), avšak nezjistilo se z jakých důvodů, Middlebrock a Phillips ho uvádějí jako nezbytný pro enzymatickou úpravu.

#### 2.1.6.2 Použití trypsinu

Místo papainu lze též použít *trypsin*, což je živočišný enzym získaný z pankreasu (slinivka) jatečního dobytka. Pracovní podmínky byly podobné jako u papainu. Zde se pouze změnila teplota, která činila 37 °C. Ztráta na váze vlny byla

okolo 3%, což poukazuje na velmi jemnou úpravu. Mohou se dosáhnout vyšší ztrátová procenta, pokud by se prováděla aktivace enzymu pomocí  $\text{CaCl}_2$  (chlorid vápenatý) [1].

**Výhody a nevýhody:** viz předchozí podkapitola.

### 2.1.6.3 Použití bakterie *Streptomyces fradiae* (SFP)

Tento experiment byl vyvinutý na počátku 90 – tých let ve Španělsku v textilním výzkumném ústavu v městě Catalunyi. Na této práci se především podíleli Cegarra, Riva a Prieto [8].

Účelem experimentu bylo vyvinout novou metodu neplstivé úpravy, která by byla ekologický nezávadná a stejně účinná jako chlorování.

Jako materiál byla použita vlněná tkanina z dvouskané příze o jemnosti 24 texů (2/24). Dále proteolytický **enzym SFP** při pH = 7,5 a teplota 50°C. Poměr lázně činil 20:1 a aplikační doba byla v rozmezí 30 – 240 min. Některé pokusy byly pak provedeny za pomoci siřičitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), který byl jakýmsi promotérem enzymatické aktivity. Koncentrace této soli byla v rozmezí 0 – 10 g/l.

Po úpravě vzorky postoupily **zkoušky sráživosti**, aby se dokázala účinnost této úpravy. Zkouška sráživosti byla provedená podle normy **ISO 6330**. V následujících tabulkách budou znázorněny výsledky tohoto experimentu [8].

Enzyme concn (g/l)	Time (min)	Shrinkage (%)	Weight loss (%)
0	0	20.4	0.7
1	30	15.6	1.6
	60	15.5	2.1
	120	14.5	2.7
	240	12.2	6.2
2	30	14.8	2.3
	60	13.5	2.6
	120	11.5	4.1
	240	12.0	9.3
3	30	13.9	2.6
	60	13.5	3.0
	120	12.5	5.1
	240	11.5	14.7
4	30	12.5	2.7
	60	12.1	3.7
	120	11.9	5.3
	240	8.7	12.5

Tab 2. – Vliv enzymatické úpravy na sráživosti a na ztrátu váhy vlněného materiálu. (stroj Cubex)

Enzyme (g/l)	Area shrinkage (%)	
	7A	7A + 2 5A
0	0	50.0
Treatment time 30 min		
1	4.0	40.8
2	3.9	40.7
3	3.7	37.9
4	1.4	37.4
5	1.2	37.3
Treatment time 60 min		
1	2.3	38.4
2	2.0	38.4
3	2.0	38.0
4	0.6	38.0
5	0.6	36.2

Tab 3 – Vliv enzymatické úpravy na sráživosti vl.mat. po procesů praní.

Enzyme (g/l)	Weight loss (%)	
	7A	7A + 2 5A
0	0	2.3
<i>Treatment time 30 min</i>		
1	0.8	1.7
2	0.9	1.8
3	0.9	2.2
4	1.8	2.2
5	1.6	2.0
<i>Treatment time 60 min</i>		
1	0.9	1.8
2	1.0	2.1
3	2.4	2.5
4	2.5	2.8
5	3.5	4.5

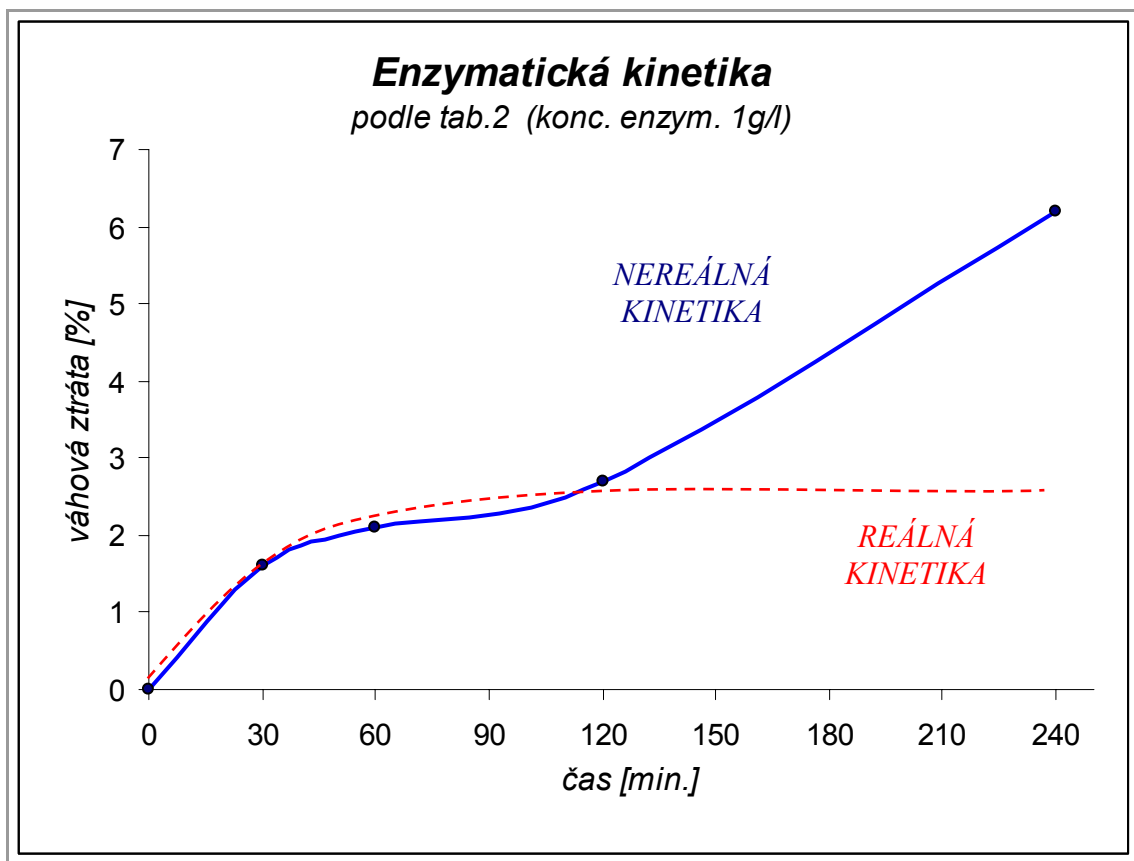
Tab. 4 - *Vliv enzymatické úpravy na ztrátu váhy vl.mat. po procesů praní.*

Enzyme (g/l)	Sodium sulphite concn (g/l)	Area shrinkage (%)	
		7A	7A + 2 5A
Treatment time 60 min			
1	0	0.7	40.6
	1	0.7	40.8
	2	0.5	39.8
	5	0.2	40.2
	10	1.8	39.3
2	0	3.3	40.3
	1	4.2	39.0
	2	6.2	38.4
	5	6.2	38.6
	10	7.0	39.0
3	0	3.3	40.2
	1	4.5	41.1
	2	4.3	39.1
	5	5.0	36.0
	10	6.3	38.4
Treatment time 60 min			
1	0	5.0	40.0
	1	3.9	39.0
	2	6.2	38.1
	5	6.4	33.0
	10	6.7	30.6
3	0	3.9	35.7
	1	-1.7	30.3
	2	-3.5	
	5	6.6	
	10	3.1	

Tab. 5 - *Vliv  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  na aktivitu enzymu a sráživosti vl.mat.*

Parameter	Untreated wool	Treatment time	
		30 min	60 min
Strength, g	9.3	8.5	7.6
Elongation, %	43.4	39.8	25.4
Alkali solubility, %	10.8	11.5	12.2
Urea-bisulphite solubility, %	32	41	43
Cystine content, %	12	12	12
Cysteine content, %	0.26	0.23	0.23
Amine end group content	206	213	220

Tab. 6 – *Vlastnosti vlny před a po enzymatické úpravě (enzym o konc. 3g/l).*



Graf 2. – kinetická křivka zobrazující závislost času na váhové ztrátě vzorku vlny při enzymatické úpravě.

**Výhody:** ekologičnost celého procesu, jemná úprava na vlněné vlákno (pokud se volí optimální konc. enzymu), pH, teplota a čas.

**Nevýhody:** je – li lázeň statická, tak úprava po celé délce vlákna není homogenní. Je nutno, aby lázeň cirkulovala.

#### KOMENTÁŘ:

Podle výše uvedeného grafu (graf.2) je nutno dodat, že tento experiment neudává vědecky prokazatelné výsledky. Kinetika, zjištěná v tomto experimentu, neodpovídá skutečné kinetice. Není možné, aby se se zvyšujícím časem exponenciálně zvýšila aktivita enzymů. Experimentálně bylo prokázáno, že při 120 min. má enzym maximální aktivitu.

Bohužel opakovatelnost tohoto experimentu je nemožná, poněvadž není uváděno o jaký typ enzymu se jedná, resp. není klasifikován dle IUB normy, EC není specifikován.

#### 2.1.6.4 Enzymatická úprava provedená podle CNR – ISMAC.

CNR – ISMAC sezione di Biella (Consiglio Nazionale di Ricerche – Istituto per lo Studio delle Macromolecole – *Národní Rada pro Výzkum – Institut pro studium makromolekuly* sekce v Bielli v Itálii) v lednu 2004 zveřejnil výsledky experimentů týkajících se enzymatické úpravy na vlnu. Výzkum probíhal následovně.

Hrubá vlna z oblasti Langhe v italském regionu Piemonte byla nejdříve vyprána a poté zpracována 4 typy enzymů (viz. Tab.7). Experimentální koncentrace enzymů byla následující: 0 g/l (pouze pufový roztok) 0,5 g/l, 1g/l a 1,5 g/l.

Enzym	Organismus/rodina	Typ	pH	T(°C)
3273 – C	Carica papaya	papain, thiol-proteasa	8,4	55
3374 – L	Bacillus subtilis (genetický modifikovaný)	Endopeptidase stabilní v oxidačním prostředí	6	65
GC897 – H	Bacillus lentus (genetický mod.)	bakteriální kmen stabilní v alkalickém prostředí	8,4	45-60
Alcalase 2,5 Type DX	L Bacillus	alkalická proteasa	8,4	55

Tab. 7 – Enzymy použity v experimentu. I zde je nutno poznamenat, že není uvedena klasifikace podle EC (enzym commission).

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat změnu omaku různých upravených vzorků (včetně neupraveného). Tyto vzorky byly pak posuzovány dle nezávislé analýzy, která měla posoudit kvalitu úprav podle omaku.

Všichni oslovení jednotně označili vzorek upravený enzymem GC 879 – H (konc. 1,0 g/l) jako ten, který výrazně převyšuje svým jemným omakem vzorek neupravený.

Experiment pokračoval dál a partie takto upravené vlny (cca 70 kg) byla poslána do vlnářské firmy F.lli Piacenza v Pollone (Bratři Piacenza) s účelem získat mykacím procesem mykanou přízí. Bohužel tento pokus se nezdařil, poněvadž na vlákne byla nalezena velká množství tenzidů (zbylých po praní), které nedovolily absorpci emulzí olej/voda před mykacím procesem [9].

I když tento experiment byl veřejně publikován, **tak autoři utajili, jak postupy úpravy, tak i enzymatická čísla podle EC.**

Je též zajímavé, že v těchto výše uvedených experimentech **není žádná zmínka ohledně analýzy post - reakčních rezidui**. Tato analýza je velmi důležitá při zkoumání reakcí mezi enzymem a substrátem (v těchto případech vlna).

### **3 Enzymy: nejrozmanitější biologické katalyzátory**

Příroda, jak je dobře známo, se řídí složitými chemickými ději, které jsou příčinou přísunu energie a stavebního materiálu z okolí pro činnost organismů. Aby tyto děje vůbec nastaly, resp. aby tyto chemické reakce odstartovaly, tak příroda si vypomáhá využitím složitých a pestrých biokatalyzátorů. Jejich nejpočetnější a nejdůležitější skupinu tvoří proteinové makromolekuly, které v sobě skrývají katalytické funkce. Pokud urychlují chemické přeměny, tak je nazýváme **enzymy**, zatím co proteinové látky, které vedou ke změnám konformaci, jsou nazývané *faktory*.

Enzymy nacházíme ve všech živých systémech a jeví druhovou specifitu, což znamená, že každý biologický druh má své vlastní enzymy. Tyto makromolekuly se odhadují na miliardy a jsou základem veškerého života na naší planetě. Důkazem jsou například zásoby ropy, uhlí, zemního plynu (metán) a neméně důležité jsou bilióny tun kyslíku, které jsou uvolňovány každý den do naší atmosféry.

Enzymy, jak je předem zmíněno, jsou složité bílkoviny, které mohou mít také nebílkovinou část nazývanou *kofaktor*. Komplexní charakter enzymů je přímo úměrný nárokům, které jsou požadovány při specifické reakci v daném biologickém systému. Jejich funkcí je koordinovat a urychlit danou reakci (vedou ke snížení aktivační energie reaktantů v systému, která je zapotřebí, aby daná reakce vůbec proběhla). Aktivita enzymů pak musí být pružná dle potřeb organismu. Bez obav můžeme tvrdit, že enzymy jako katalyzátory díky dlouhodobému vývoji (milióny a milióny let) jsou dokonalejší než uměle vytvořené katalyzátory používané v moderní chemii. Důkaz tohoto tvrzení je popsán v těchto následujících pěti bodech:

1). **Vysoká účinnost**; jedna molekula enzymu je schopná během 1 s přeměnit až  $5 \cdot 10^4$  molekul substrátu. To převyšuje o několik řádů chemické katalyzátory.

Příkladem může být rozklad peroxidu vodíku, který se za normálních okolností rozkládá o hodnotě rychlostní konstanty  $0,23 \text{ s}^{-1}$ . Při katalýze pomocí platiny rychlostní

konstanta činí  $1,3 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$  a při enzymové katalýse (enzym katalasa) má hodnotu  $3,7 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ .

2). **Značná specifita** týká se reakcí a substrátu.

3). **Pracovní podmínky**; enzymy pracují většinou za mírných podmínek. Teplota se pohybuje okolo  $20 - 40^\circ\text{C}$ , tlak  $10^5 \text{ Pa}$  a pH většinou kolem neutrality.

4). **Regulovatelný účinek**; enzymy lze regulovat v průběhu reakce tak, abychom splnili dané požadavky.

5). **Netoxičnost**; vzhledem k jejich původu (přírodní), jsou enzymy totálně netoxické, což znamená, že mají značné výhody vůči umělým průmyslovým katalyzátorům [10].

### 3.1 Klasifikace enzymů

Na počátku byly tyto makromolekuly pojmenovány dle objevitele nebo byly použity triviální názvy většinou s koncovkou **-in**, které jsou dodnes pro některé enzymy používány (například pepsin, trypsin). Později v roce 1883 podle pana J.Duclaux byla zvolena koncovka **-asa**.

Časem se tyto názvy jevily nedostačující, poněvadž vzrůstal počet objevených enzymů. V roce 1961 **enzymová komise Mezinárodní unie biochemie (IUB)** vedle triviálních názvů zavedla jejich racionální rozdělení, které vedlo k vytvoření **systémových názvů** enzymů, v nichž je zahrnutý jak substrát, tak i typ katalýsy. Proto klasifikujeme enzymy do šesti hlavních tříd:

1. **Oxidoreduktasy**. Nejpočetnější třída všech známých enzymů. Oxidoredukční děje, jak vyplývá z názvu, jsou uskutečňovány přenosem atomů vodíku (trasyhydrogenasa a dehydrogenasa), elektronů (transelektronasy) nebo zavedením kyslíku do substrátu (oxygenasy).
2. **Transferasy**. Uskutečňují přenos skupin  $-\text{CH}_3$ ,  $\text{NH}_2$  (methyl, amin) a zbytek glukosy v aktivované formě z jejich donoru na akceptor (aminotransferasa).
3. **Hydrolasy**. Štěpí hydrolytické vazby vzniklé kondensací peptidové (amidové), glykosidové a esterové skupiny. Např. *proteasy* (peptidasy) štěpí peptidové vazby v molekulách bílkovin a peptidů.
4. **Lyasy**. Katalysují nehydrolytické štěpení a vznik vazeb C-C, C-O, C-N. Je to poměrně málo početná skupina.

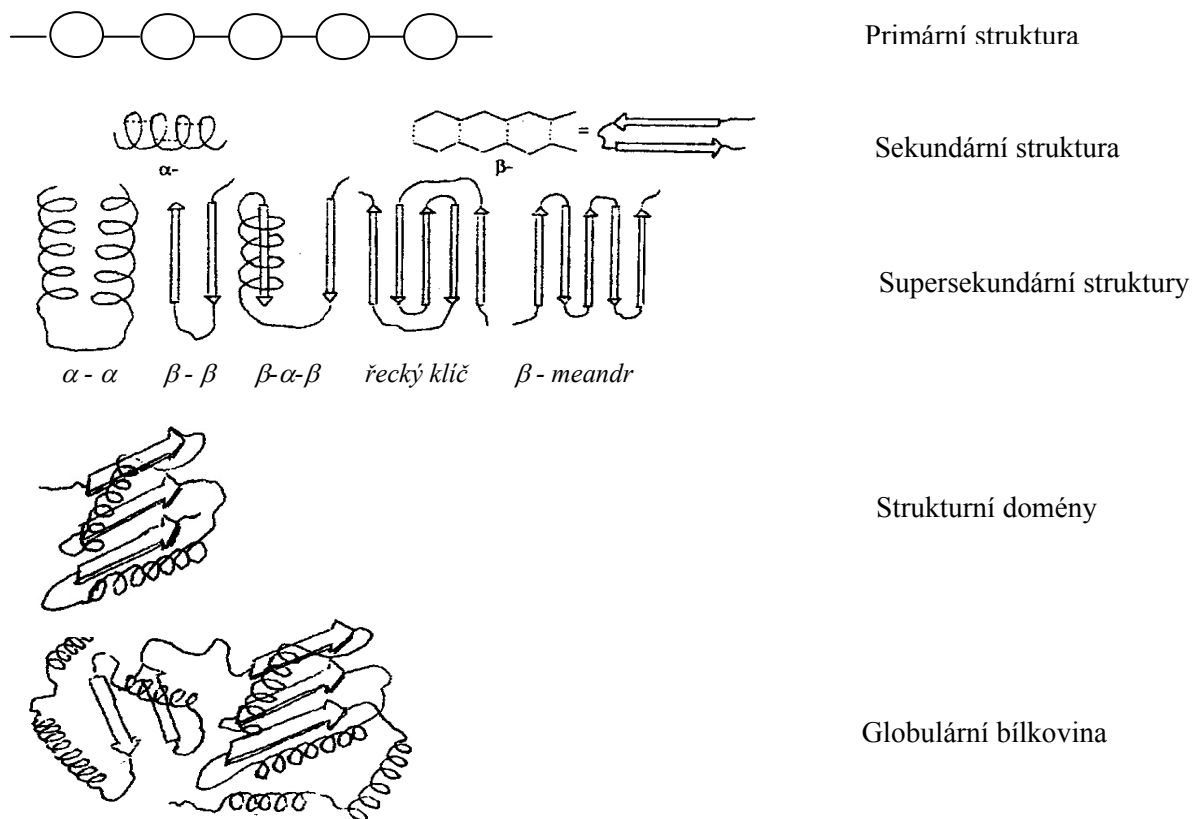


5. **Isomerasy.** Realizují přesuny atomů vnitromolekulového charakteru. Je to nejméně početná skupina enzymů.
6. **Ligasy.** Katalysují energeticky náročné vazby za rozkladu látky uvolňující energii.

Tyto předem zmíněné třídy mají také značné množství podtříd. Ty se pak dělí na podpodtřídy, které vedly k vytvoření 4 místného číselného kódu (**EC**) a jsou jakýmsi rodným číslem daného enzymu. Tyto číselné kódy nejsou pro praktické použití snadné a tak se většinou dává přednost triviálním názvům, které jsou lépe zapamatovatelné [10].

### 3.2 Konformační struktura proteinů

Jak již bylo zmíněno v *kap. 1.2.1*, enzymy jsou tvořeny syntézou různých  $\alpha$  - aminokyselin. Kondenzací těchto sloučenin vznikají polypeptidické řetězce, které zaujímají různé geometrické tvary (struktury) viz. *obr. 14*.

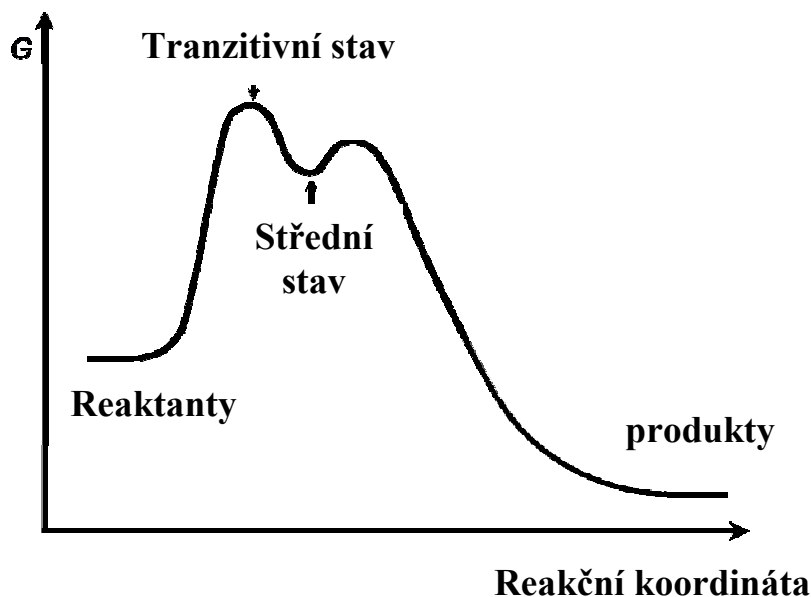


Obr. 14 – proces svinování polypeptidového řetězce a hierarchie jeho uspořádání

Pro zajímavost existují cca  $10^{45}$  možných konformací, které mohou řetězce ujmout. Výběr je takový, který odpovídá minimální Gibbsové energii celého systému [4, 10].

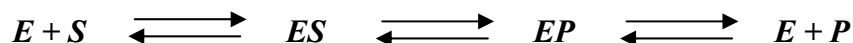
### 3.3 Mechanismus enzymatické katalýzy

Jak už bylo několikrát řečeno, enzymy jsou přírodní látky, které v chemických reakcích, v živých organismech, fungují jako katalyzátory. Obecně je katalyzátor sloučenina, jejíž funkcí je snížit aktivační energii daného systému, aby mezi reaktanty nastala taková reakce, která by vedla k vytvoření produktu, viz. *graf. 3*.



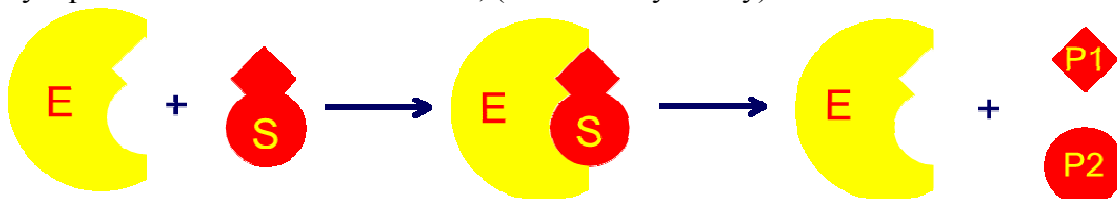
Graf. 3 – funkce katalyzátoru při chemické reakci.

Reakce mezi enzymem a reaktantem za vytvoření produktu lze schematicky vysvětlit takto:



kde *S* je substrát (reaktant), který se pomocí enzymu přemění na příslušný produkt *P*. Fáze, kde se vytvoří komplex *ES* a *EP*, jsou velmi důležité. Na nich závisí průběh celé reakce. Proto lze předpokládat, že mezi enzymem a substrátem existuje nějaká specifická komplementarita.

V roce 1894 *Fisher* předpokládal, že pro každý enzym musí existovat příslušný substrát. Byla počatá tzv. teorie **zámku a klíče**, (lock and key theory) viz *obr. 16*.

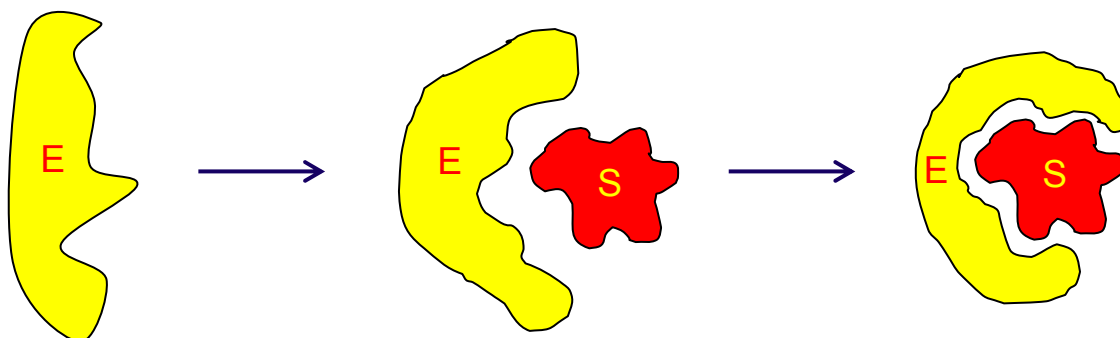


Obr.16 – Fischerova teorie klíče a zámku

Časem se tato teorie ukázala

nepravdivá, poněvadž nedokázala vysvětlit některé reakce mezi enzymem a substrátem, které se dle této teorie nechovaly. Pouze v roce 1958 *Koshland* představil teorii o

**indukovaném přizpůsobení** (induced fit) mezi substrátem a enzymem, která vysvětlovala její vzájemnou komplementaritu jako např. „ruka k rukavici“, viz obr. 17.

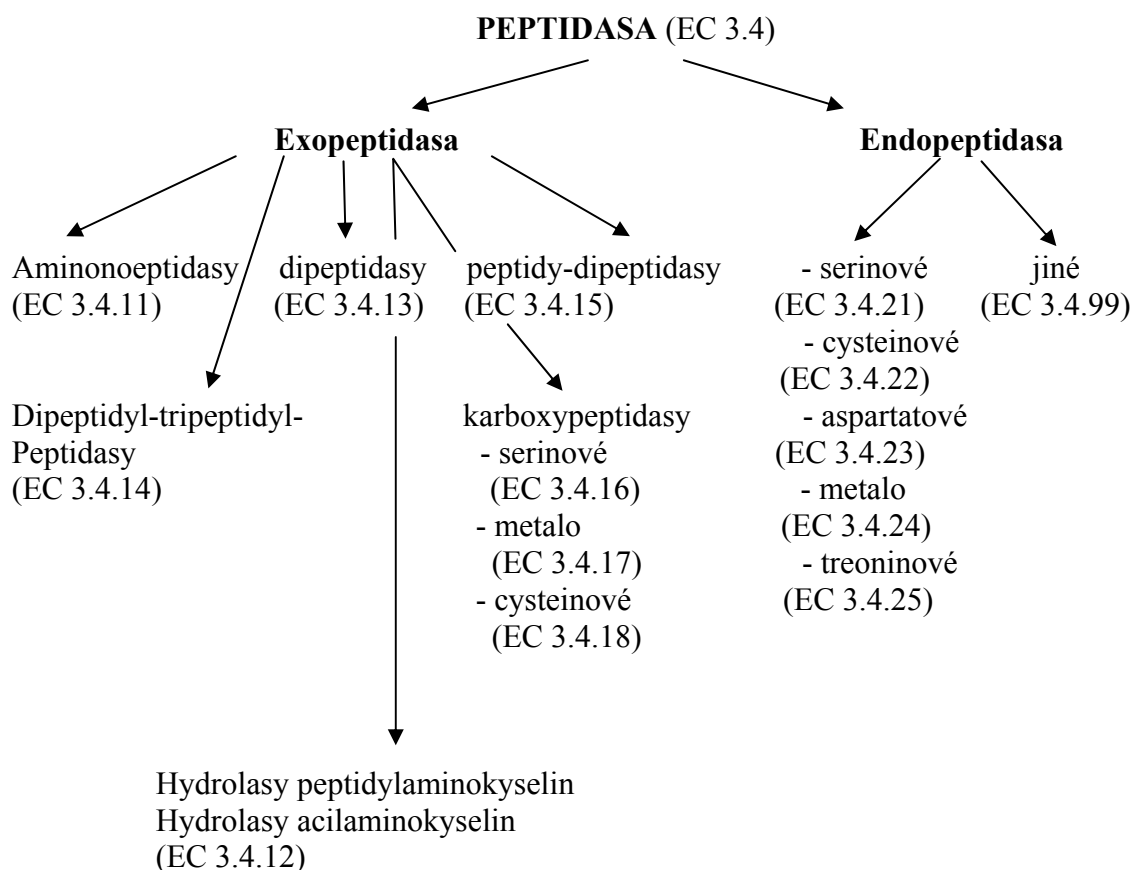


Obr.17 – Indukované přizpůsobení enzymu vůči substrátu. Část enzymu, která přilehá k substrátu je aktivním (reaktivním) místem enzymatické makromolekuly.

Ve své podstatě se enzym geometricky (změna konformace) přizpůsobí tak, aby jeho aktivní centrum mohlo reagovat se substrátem. Zbývající část enzymu nereaguje, ale zaručuje prostorovou stabilitu. Tyto konformační změny svědčí o tom, že enzymy jsou flexibilní makromolekuly a lehce se dokážou přeměnit dle daného substrátu. Samozřejmě je nutno dodat, že i zde platí určitá specifická mezi substrátem a enzymem (viz. lock and key theory). To znamená např., že pokud máme enzym, který reaguje se substrátem s formou *D* nějakého cukru, tentýž enzym bude inertní vůči formě *L* [10, 11].

### 3.4 Enzymy používané na vlněné vlákno. Chemická struktura charakteristické vlastnosti.

Tyto enzymy patří do podtřídy **peptidasy** (hydrolasy) a dále se dělí na podpodtřídy **exopeptidasy** a **endopeptidasy** obr. 18 [12].



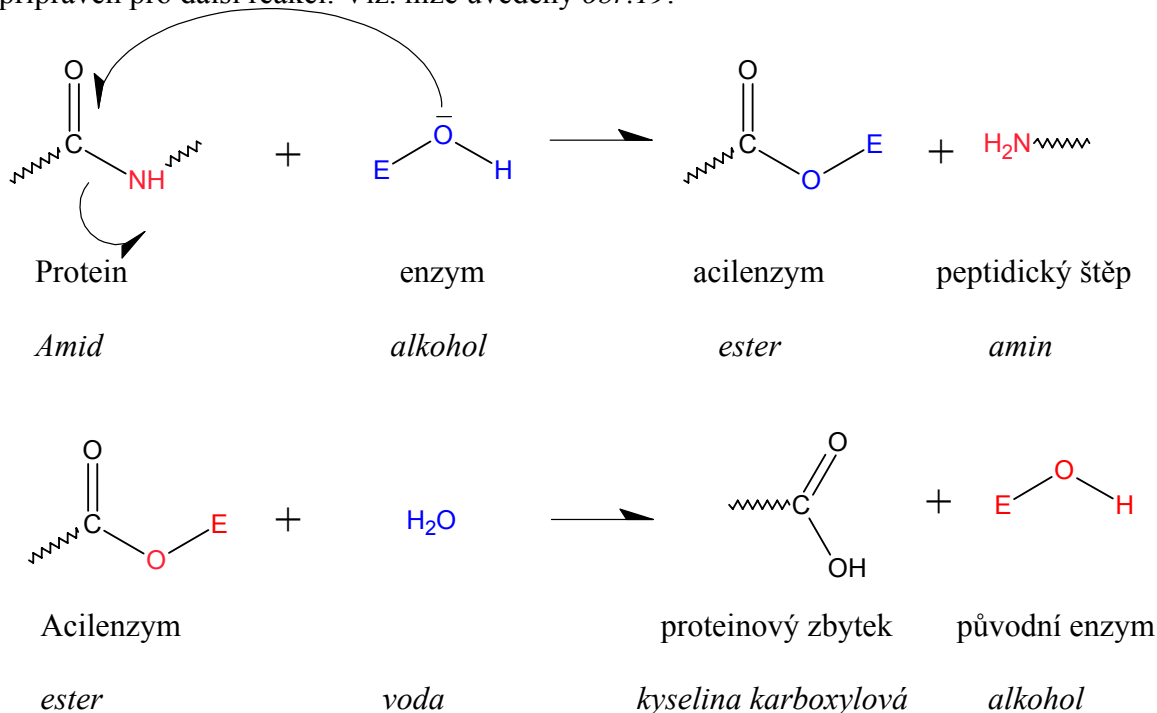
Obr. 18 – rozdělení peptidas podle IUBMB (Mezinárodní unie pro biochemie a molekulární biologii).

### 3.4.1 $\alpha$ - chymotrypsin

Tento enzym patří do třídy hydrolasy a dle IUB je značen následovně: **EC 3.4.21.1.**

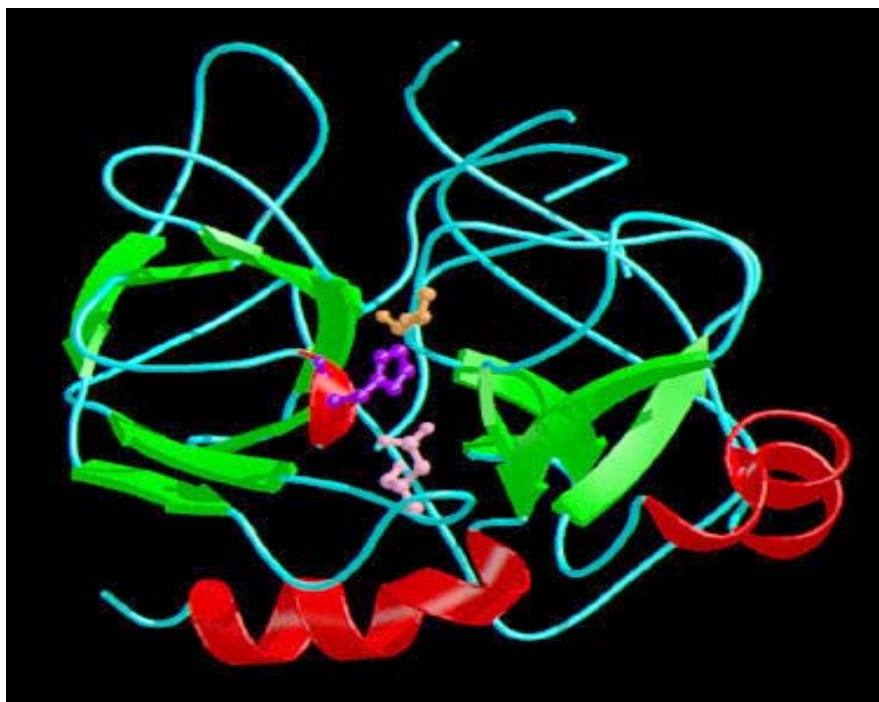
Je to peptidasa, což znamená, že intereaguje s polypeptidickými řetězci. Můžeme ho najít v trávicím traktu a jeho sekvence obsahuje 245 aminokyselin. Je solubilní a to proto, že jeho lipofilní část je geometricky uspořádána tak, aby měla co nejmenší styčnou plochu s vodou, načež jeho hydrofilní část je s ní v přímém kontaktu. Rozpustnost je dána prostřednictvím početních vodíkových můstků.

Dle teoretických poznatků tento enzym reaguje ve dvou stádiích. V prvním stadiu se aktivní část enzymu chová jako alkohol (alkolýsa). V druhém stádiu probíhá esterová hydrolýza za vytvoření kyseliny karboxylové a nezměněného enzymu, který je připraven pro další reakci. Viz. níže uvedený *obr. 19*.

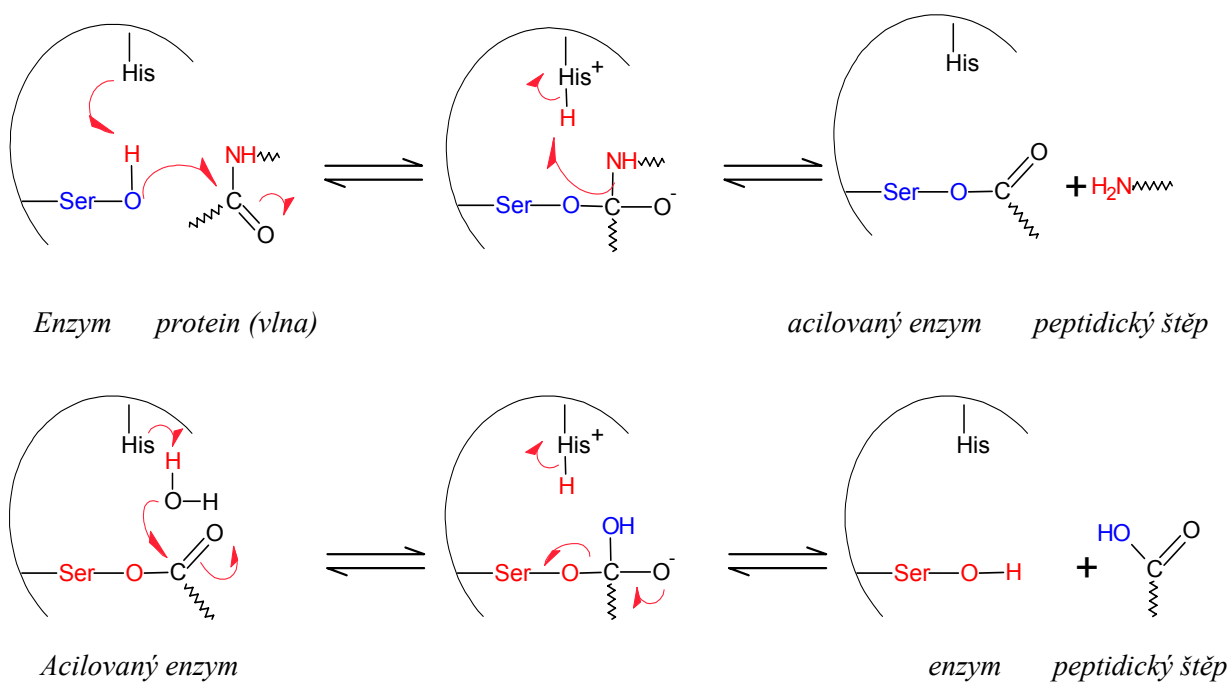


Obr. 18 – zjednodušená demonstrace katalytické reakce enzymů patřící do kategorie hydrolas..

Dle další analýzy se zjistilo, že alkoholická skupina, která je výše znázorněná, patří do složité molekuly enzymu aminokyseliny serin – 195 (číslo znázorňuje pozici v peptidickém řetězci) viz. *obr. 19*.



Obr. 20 – Molekulární struktura  $\alpha$  - chymotrypsinu. Část označená oranžovou barvou značí aminokyselinu serin – 195, fialové je pak zabarvený histidin.



Obr. 20 – reakční mechanismus mezi enzymem a substrátem. Přítomnost histidinové báze urychluje celý proces (v obr. 19 je znázorněná fialovou barvou).

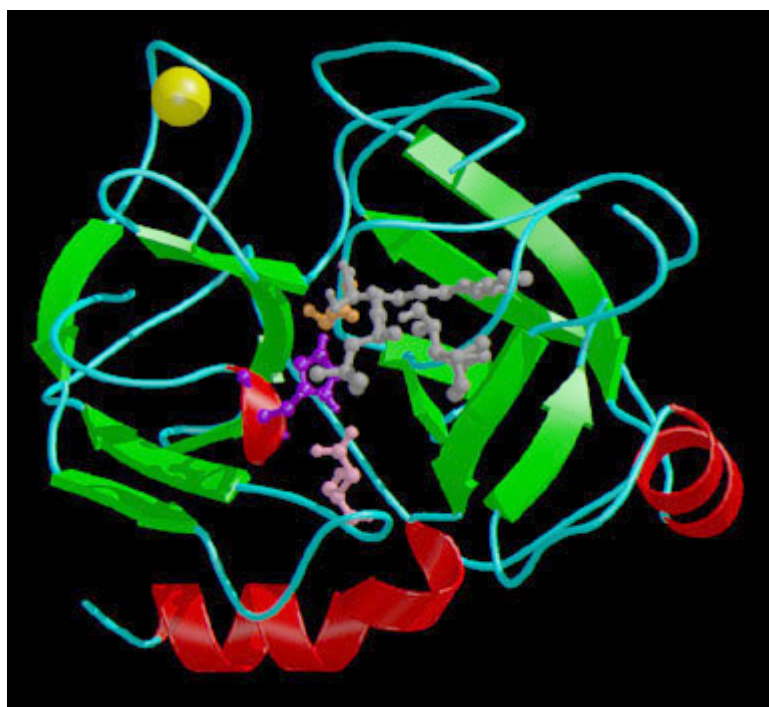
Operativní podmínky pro tento enzym jsou následující: [4, 10, 11, 13- 16]

- ✚ **pH interval** = od 6,5 do 9,5.
- ✚ **pH max. aktivity** = 7,2 – 7,8
- ✚ **Optimální teplota T** = 33 °C.

### 3.4.2 Trypsin




Tento enzym opět patří do třídy hydrolas (peptidasa), lze ho nalézt v trávicím traktu a jeho produkce zajišťuje pancreas (slinivka). Je na trhu zcela běžně dostupný a jeho cena je nízká. Štěpí polypeptidické řetězce pouze v místech, kde se na tvorbě peptidové vazby podílejí karboxylová skupina argininu a lysinu. Reakční mechanismus je zcela podobný jako u  $\alpha$  - chymotrypsinu. Je nutno dodat, že tento enzym potřebuje k aktivaci chlorid vápenatý  $\text{CaCl}_2$ .

Dle IUB nomenklatury tento enzym je klasifikován pod následujícím číslem: **EC 3.4.21.4** a jeho struktura je znázorněná níže na *obr. 21*.



Obr. 21 – Konformační struktura trypsinu. I zde lze nalézt serinovou jednotku (oranžové zabarvení), histidin (fialové zabarvení), který úzce souvisí s katalytickým mechanismem tohoto enzymu. Žlutá sféra znázorňuje vápenatý iont  $\text{Ca}^{++}$ .




Operativní podmínky pro tento enzym jsou následující: [4, 10 – 16]

-  **pH interval** = od 6,5 do 8,5.
-  **pH max. aktivity** = 7 – 8
-  **Optimální teplota T** = 45°C.

### 3.4.3 *Aspergillus saitoi* (*Aspergillus phoenicis*)

Jeho identifikační číslo je **EC 3.4.23.18** a jedná se o bakteriální enzym (produkovan bakteriemi). Štěpí polypeptidické vazby především v místech, kde se na tvorbu této vazby podílí jakákoliv aminokyselina a prolin.

Operativní podmínky pro tento enzym jsou následující: [13 – 16]




-  **pH interval** = od 4 do 6.
-  **pH max. aktivity** = 3,5
-  **Optimální teplota T** = 30C.

### 3.4.4 *Papain* (*Carica Papaya*)

Identifikační číslo tohoto enzymu je **EC 3.4.22.2.**, patří do kategorie cystein - endopeptidasa a hydrolyzuje proteiny v peptidických můstcích, zejména u aminokyselin, které v postranním řetězci jeví značnou lipofilitu. Štěpí polypeptidické vazby především v místech, kde na tvorbu této vazby se podílí jakákoliv aminokyselina a prolin nebo methionin.

Je nutno dodat, že tento enzym je získán z rostlinného substrátu, přesněji ze stromu papaiovníku (rod Caricaceae).

Operativní podmínky pro tento enzym jsou následující: [13 – 16]

-  **pH interval** = od 5 do 8.
-  **pH max. aktivity** = 7,2
-  **Optimální teplota T** = od 25°C do 70°C má ustálenou aktivitu okolo 65%.



### 3.4.5 Bromelain

I tento enzym patří do kategorie rostlinných enzymů (získává se z *ananas cosmus*) a jeho identifikační číslo, podle IUB nomenklatury, je **EC 3.4.22.33**. Je to peptidasa a tudíž je schopný štěpit peptidycké vazby především v místech, kde jsou přítomny aminokyseliny phenylalanin, arganin a valin.

Operativní podmínky pro tento enzym jsou následující: [13 – 16]

✚ **pH interval** = od 4 do 8,5.

✚ **pH max. aktivity** = 6,5

✚ **Optimální teplota T** = od 30°C do 70°C má ustálenou aktivitu.

## 4 .Statistické metody pro zpracování výsledků měření

Pro statistické zpracování naměřených hodnot se používá charakteristika polohy a variability.

Mezi základní charakteristiky polohy patří *aritmetický průměr*. Ten je definován jako součet všech hodnot dělený jejich počtem a je vyjádřen vzorcem,

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i, \quad (4.1.)$$

kde **n** je počet hodnot a **x<sub>i</sub>** jsou jednotlivé hodnoty.

Průměr zakrývá a vyhlazuje krajnosti (extrémy) a zároveň je však jimi ovlivňován. Je nutné jej používat spolu s údaji o rozptylu (variabilitě) hodnot.

Charakteristiky variability udávají koncentraci nebo-li rozptýlení hodnot kolem zvoleného středu skupiny hodnot. Sem patří rozptyl, směrodatná odchylka a variační koeficient.

Rozptyl  $s^2$  je definován jako součet kvadratických odchylek  $x_i$  od průměru  $\bar{x}$  dělený rozsahem výběru **n** zmenšeným o 1.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (4.2.)$$

*Směrodatná odchylka*  $s$  je definovaná jako odmocnina z rozptylu  $s^2$ . Používá se nejčastěji pro charakteristiku variability. Malé hodnoty rozptylu zvyšují význam průměru, kdežto velké hodnoty rozptylu značí velkou variabilitu naměřených hodnot.

*Variační koeficient*  $v$  [%] slouží k měření relativní variability. Je definován jako podíl směrodatné odchylky  $s$  a průměru  $\bar{x}$ .

$$v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4.3.)$$

Je možné jej použít také pro porovnání variability znaků měřených v odlišných jednotkách [17].

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5 Enzymatická úprava vlněného vlákna

Cílem této diplomové práce je studium chemicko – fyzikálních změn po úpravě vlněného vlákna různými typy enzymů, které byly pečlivě vybrány na základě jejich reaktivity vůči danému materiálu (viz [kap. 3.4](#)). Aby byl podán důkaz, že enzymatická úprava je šetrnější než klasické chlorování a dodává vlněnému vláknu určité vlastnosti, postup experimentu byl rozdělen do následujících částí:

- ✚ Stanovení úbytku hmotnosti;
- ✚ Zkouška pevnosti a tažnosti;
- ✚ Tenkovsrtavná chromatografie;
- ✚ Kombinace více enzymů;
- ✚ Stanovení obsahu cysteinu (cystinu), a dalších aminokyselin;
- ✚ Studium omaku.

Tyto body nám poskytnou důležité informace ohledně působení enzymu na vlněné vlákno a to především na vnější vrstvu (*epikutikula*), která podléhá hydrolýze (*alkolýza*).

Tyto jednotlivé experimenty byly prováděny s vypranou vlnou (neionogenné praní - Syntapon N o koncentraci 0,5 – 0,8 g.l<sup>-1</sup>, doba praní 10 min. a teplota lázně T=30°C) pocházející z německé ovce. Tato ovce byla zkřížena mezi plemenem Merino a německou hrubovlnou ovci. Střih byl prováděn těsně před zimou a byly odebrány vzorky z povrchu celého těla kromě končetin. Průměrná zjištěná *jemnost* činila 22,2 dtex.

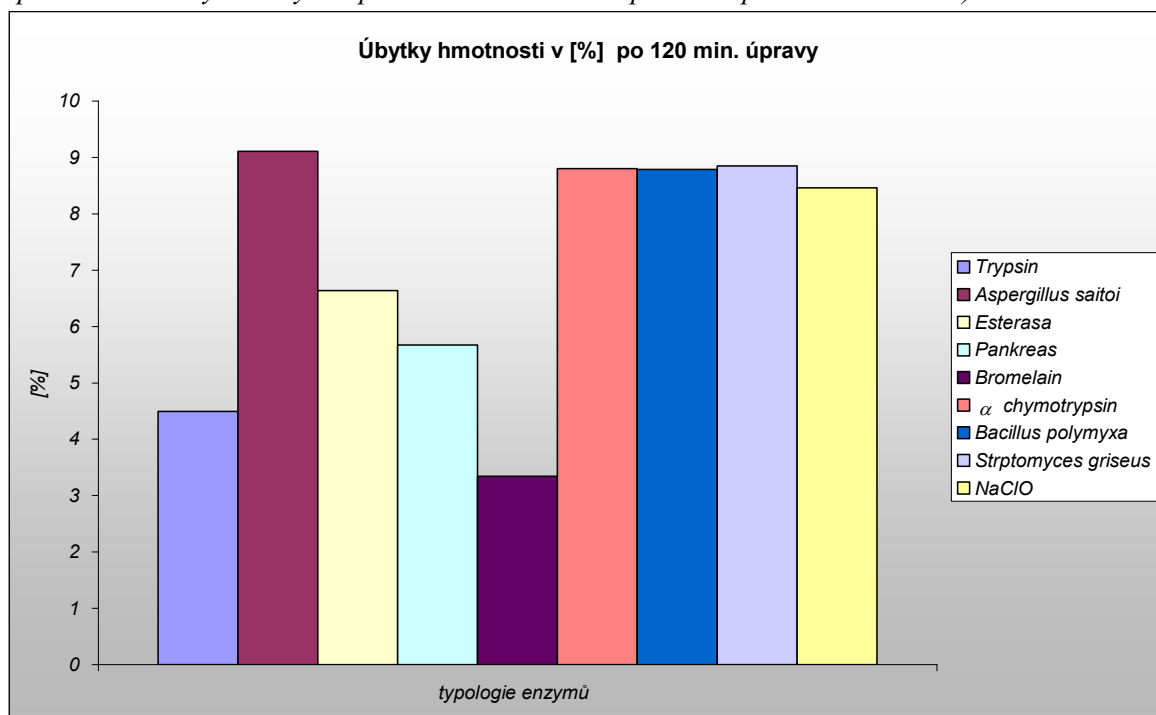
#### 5.1 Stanovení úbytku hmotnosti vláken.

Všechny vzorky vláken byly zváženy před a po enzymatických úpravách. Navážky neupravených vlněných vláken měly hmotnost cca 3g. Následně byly vzorky naklocované v 50 ml lázni, kde každá lázeň obsahovala pufr (tj. slabá kyselina a její sůl nebo slabá zásada a její sůl) [18], zkoumaný enzym o konc. 1g.l<sup>-1</sup>, případně příslušný enzymový aktivátor a organické rozpouštědlo (viz. *Tab.8*). Takto připravené vzorky byly podrobeny enzymatické hydrolýze v termostatu s nastavenou teplotou 33°C, tj.

enzymatická inkubační teplota neboli teplota, při které se enzym stává aktivní. Po 10 minutách byly klocované vzorky průběžně promíchávány, aby bylo zachováno homogennější rozložení enzymu na materiálu. Odběry vláken ze vzorků pro následné měření pevnosti a tažnosti (viz. *kap.4.2* ) se prováděly po 60, 90 a 120 minutách (při 120 min. dle kinetické rovnice, viz. *graf 2*, je max. aktivita enzymu) a měření úbytku hmotnosti se provedlo za standardních laboratorních podmínek, které byly striktně dodržovány ( $T = 20^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RH} = 65\%$ ) [19].

Název ENZYMU	pH	Aktivátor	Organické rozpouštědlo	Úbytek hmotnosti v [%]
<i>Trypsin</i>	7,2 fosfátový pufr	$\text{CaCl}_2$	-	4,49
<i>Aspergillus saitoi</i>	4,5 octanový pufr	-	-	9,11
<i>Esterasa</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	DMF (0,5ml)	6,64
<i>Pancreas</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	-	5,67
<i>Bromelain</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	DMF (0,5ml)	3,34
$\alpha$ - <i>chymotrypsin</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	DMF (0,5ml)	8,80
<i>Bacillus polymyxa</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	DMF (0,5ml)	8,79
<i>Strptomyces griseus</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	-	8,85
$\text{NaClO}^*$	4 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )	-	-	8,46

Tab. 8 - obsahuje složení jednotlivých lázní pro enzymatické úpravy a zároveň udává úbytek hmotnosti vlněných vzorků po 120 min klocování (\* obecně vzato se chloruje 90 minut, ale pro porovnání s enzymatickými úpravami se chlorování provedlo po dobu 120 minut).



Graf.4 – tento histogram znázorňuje různé úbytky hmotností vzorků v procentech při aplikaci odlišných enzymů.

**POZN.:** Chlorování bylo prováděno podle klasického postupu čili: délka lázně 1:40, obsah aktivního chloru 1g/l, smáčecí prostředek Syntegal V20 o konc. 1g/l, kyselina sírová  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH = 4), teplota úpravy 20 – 22°C (chloruje se za studena). Poté následuje krátký oplach opět v kys. sírové a anichlorování za pomoci hydrogensířičitanu sodného  $\text{NaHSO}_3$  o konc. 1 – 4%. Antichloruje se 20 min při teplotě 30 – 40°C.

## **5.2 Zkouška pevnosti a tažnosti vlněných vláken po enzymatické úpravě**

Tato zkouška slouží ke zkoumání pevnosti a tažnosti vláken, v tomto případě vlněných vláken, za sucha nebo za mokra. Výsledky pak mohou ukázat, jak je zkoumané vlákno odolné vůči mechanickému namáhání a tudíž lze předpovídat jeho chování při dalším zpracování (např. zušlechťovací procesy).

Zkoumané vzorky podrobené enzymatické úpravě byly trhány na přístrojích vibrodyn/vibroskop 400 od fy Lenzig na katedře materiálů fakulty textilní v Liberci (viz.níže uvedený *obr.22*).



Obr. 22 – vibrodyn (trhací zařízení) a vibroskop (zařízení na měření jemnosti vláken).

Princip měření na vibroskopu a na vibrodynu byl následující: u zkoumaného vlákna se nejdříve zjistila jeho jemnost a poté jeho pevnost. Takto získané hodnoty byly zpracovány připojeným PC za pomoci softwaru od předem zmíněné fy, který byl dodán k těmto přístrojům. Citovaný software je schopen statisticky zpracovat tato data, ale neprovádí tzv. *test homogeneity* (vyloučení vybočujících hodnot). Tyto výsledky slouží

pouze orientačně. Proto experimentálně zjištěná data byla dále zpracovaná v souladu se statistickými pravidly (viz. *kap. 4*).

Tyto zkoušky byly provedeny dle příslušné normy ČSN 80 0200 [20].

Doporučuje se držet se jiné normy a tj. normy ČSN 80 0240 [21], kde počet měření se mění z minimálního množství  $n=50$  u té první, na  $n=600$  u té druhé, čímž se sníží variační koeficient, tj. chyba měření, který je pro vlněné vlákno obecně vysoký důsledkem jeho značné nestejnoměrnosti. Aby se snížil tento parametr, tak ve výpočtech byly odstraněny vybočující hodnoty v souladu se statistickými pravidly.

### PARAMETRY MĚŘENÍ

V následující tabulce (*Tab. 9*) jsou uvedeny parametry pro nastavení přístroje používaného pro tento experiment.

Parametry	
<i>Rozpětí čelisti v [mm]</i>	<b>10</b>
<i>Předpětí v [mg]</i>	<b>1000</b>
<i>Rychlost testu v [mm/min]</i>	<b>10</b>

Tab. 9 – nastavené parametry na trhacím zařízení.

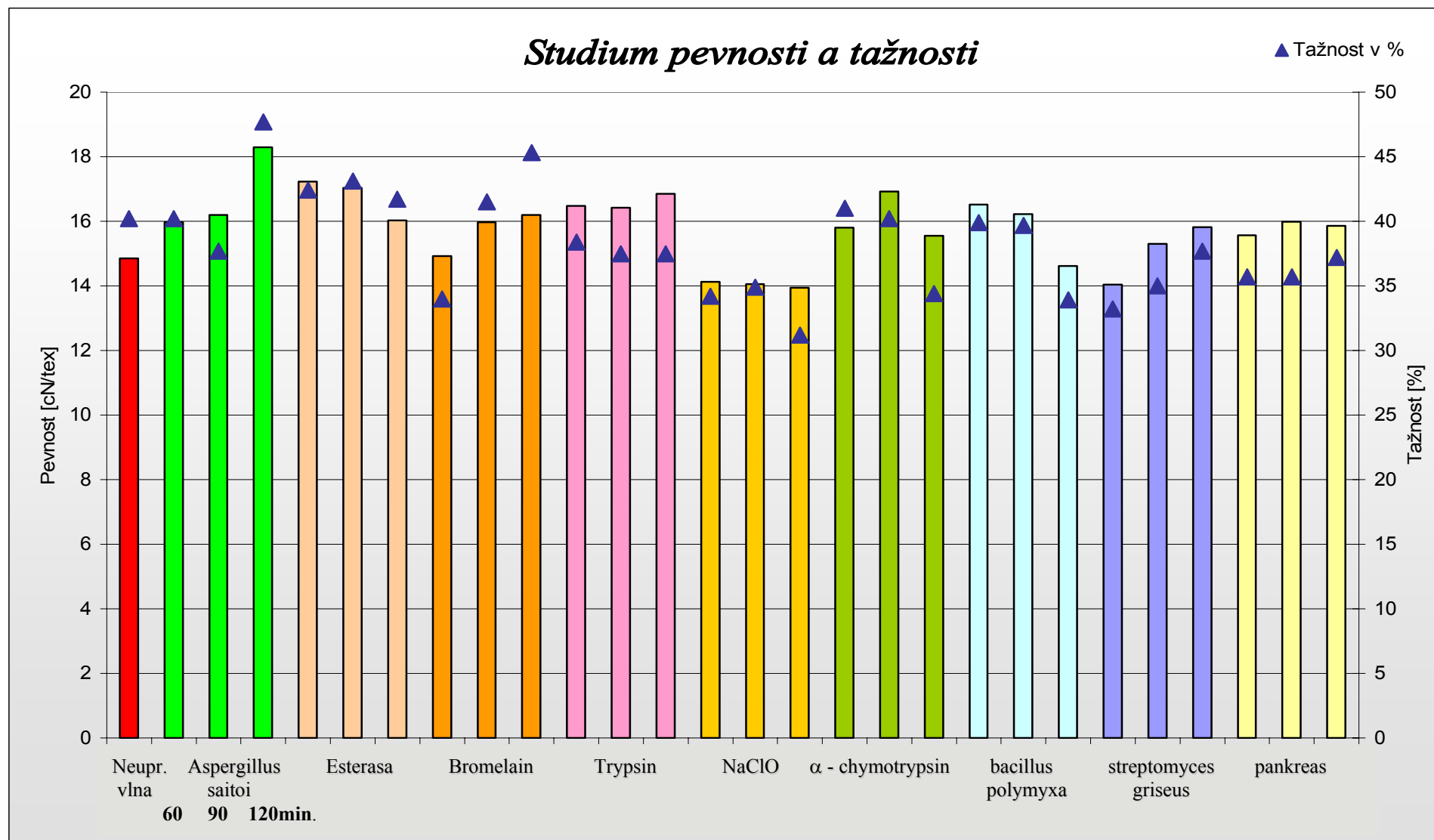
### **Výsledky měření:**

Celkem se potrhalo přes 1500 vláken a výsledky, které jsou níže znázorněny na následujících dvou stránkách v *Tab. 10* a v *graf. 5 - 6*, byly velmi překvapující.

**Pozn.:** Hodnoty, které jsou uvedeny v *Tab. 10* mohou být porovnány s hodnotami (teoretickými) citované v *kap. 1.3.1.1*.

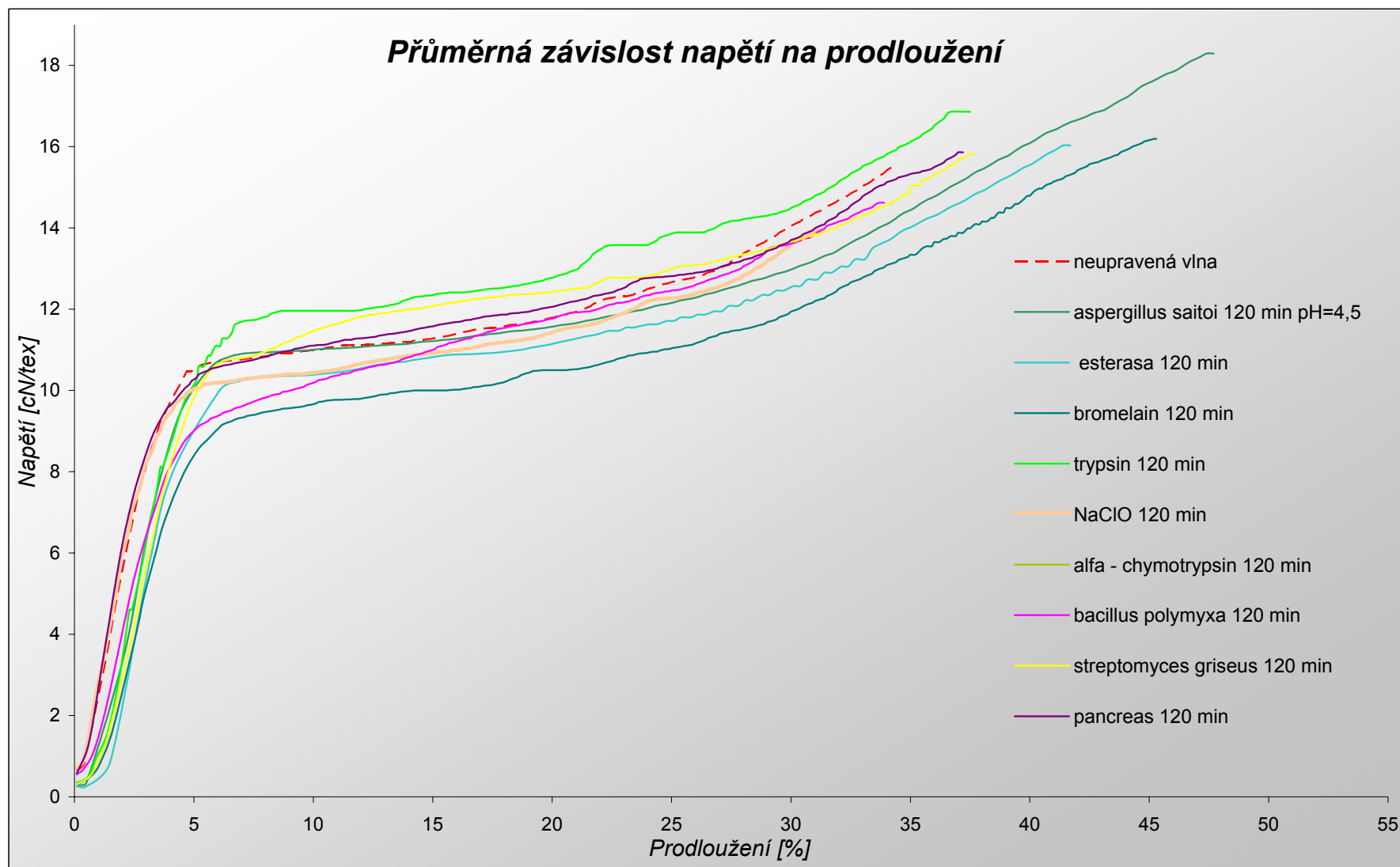
<b>Průměrné hodnoty pevnosti a tažnosti vláken po enzym.úpravě</b>		
<b>Typ Vzorků</b>	<b>Prodloužení [%]</b>	<b>Pevnost [cN/tex]</b>
<i>Neupravená vlna</i>	40,2	14,86
<i>Aspergillus saitoi 60 min</i>	40,2	15,97
<i>Aspergillus saitoi 90 min</i>	37,7	16,20
<i>Aspergillus saitoi 120 min</i>	47,7	18,29
<i>Esterasa 60 min</i>	42,4	17,23
<i>Esterasa 90 min</i>	43,1	17,03
<i>Esterasa 120 min</i>	41,7	16,03
<i>Bromelain 60 min</i>	34,0	14,93
<i>Bromelain 90 min</i>	41,5	15,97
<i>Bromelain 120 min</i>	45,3	16,19
<i>Trypsin 60 min</i>	38,4	16,47
<i>Trypsin 90 min</i>	37,5	16,42
<i>Trypsin 120 min</i>	37,5	16,86
<i>NaClO 60 min</i>	34,2	14,12
<i>NaClO 90 min</i>	34,9	14,06
<i>NaClO 120 min</i>	31,2	13,94
<i>a - chymotrypsin 60 min</i>	41,0	15,81
<i>a - chymotrypsin 90 min</i>	40,2	16,92
<i>a - chymotrypsin 120 min</i>	34,4	15,55
<i>bacillus polymyia 60 min</i>	39,9	16,52
<i>bacillus polymyxa 90 min</i>	39,7	16,22
<i>bacillus polymyxa 120 min</i>	33,9	14,62
<i>streptomyces griseus 60 min</i>	33,2	14,04
<i>streptomyces griseus 90 min</i>	35,0	15,30
<i>streptomyces griseus 120 min</i>	37,7	15,82
<i>pancreas 60 min</i>	35,7	15,57
<i>pancreas 90 min</i>	35,7	15,98
<i>pancreas 120 min</i>	37,2	15,86

Tab. 10 – průměrné hodnoty pevnosti a tažnosti po enzymatické úpravě vlněných vláken. Čas, který je zobrazen u každé položky, znázorňuje celkovou dobu úpravy.

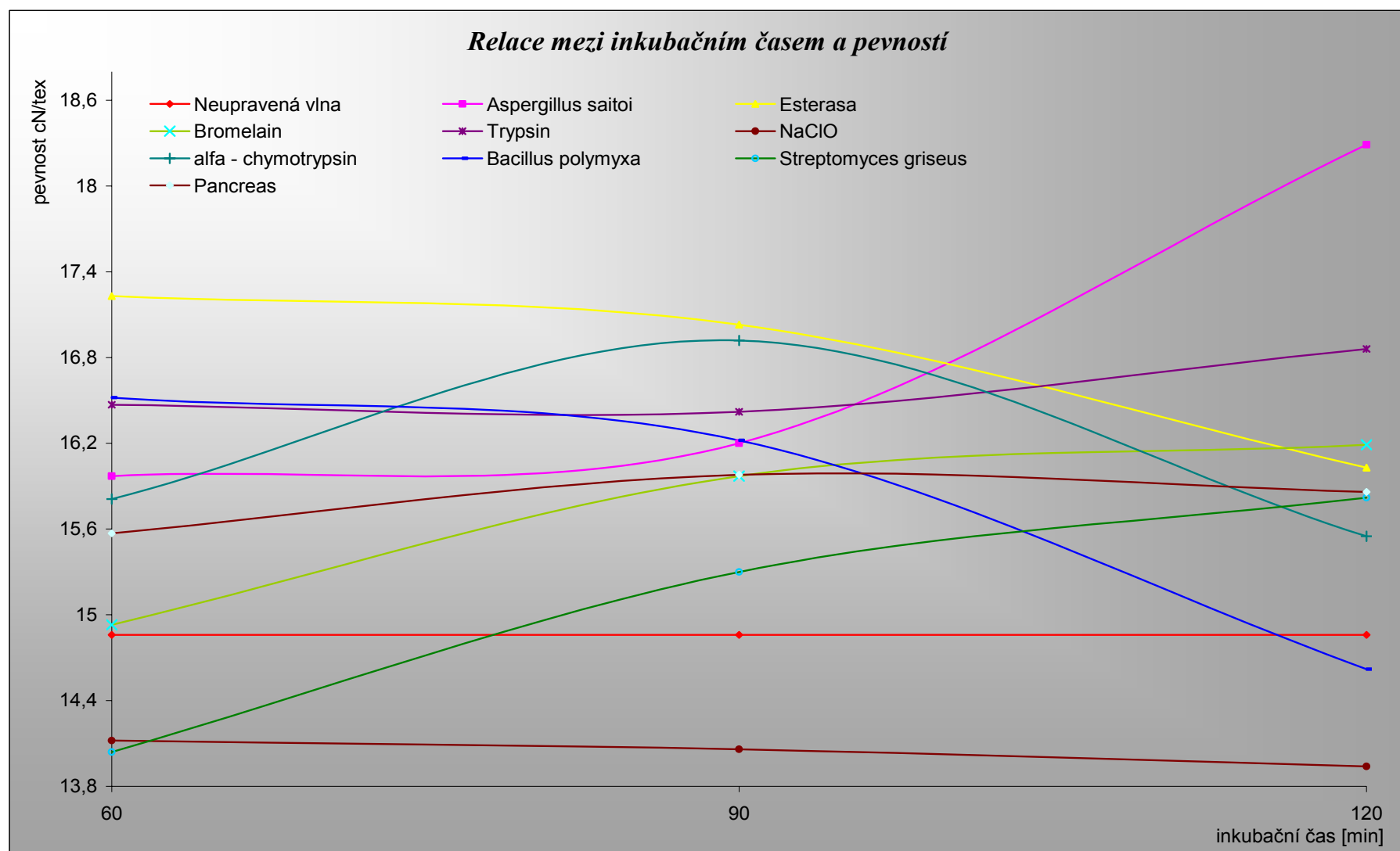


Graf. 5 – závislost pevnosti a tažnosti vlněných vláken po enzymatické a chlornanové úpravě.





Graf. 6 – pracovní diagram vlněných vláken, které byly podrobeny enzymatické a chlornanové úpravě (teoretický odkaz v kap. 1.3.1.1.).



Graf.7 – reakční kinetika.

### 5.3 Tenkovrstevná chromatografie

Na rozdíl od klasické papírové chromatografie, stacionární fáze u tenkovrstevné chromatografie je tvořená tenkou vrstvou jemnozrnného sorbentu nebo nosiče, jenž je rozprostřen buď volně nebo je fixován na vhodné podložce. Materiál tvořící podložku je obvykle ze skla, hliníku nebo plastové folie.

Dělení látek, dle typů stacionárních fází, probíhá na základě různých mechanismů: může to být adsorpce, rozdělování mechanickou výměnou iontů, výlukou (molekulová síta) aj.[22].

V tomto experimentu byla použita tenkovrstevná deska z mikrocelulózy (250  $\mu\text{m}$ ) na skle o rozměrech 20x20  $\text{cm}$  dodána od fy. Analtech, Inc. Pro detekci bylo použito detekční činidlo ninhydrin (0,1% v acetonu) a mobilní fáze byla vytvořená ze směsi butanolu, octové kyseliny 96 % - ní a vody. Vše v poměru 120 : 50 : 30.

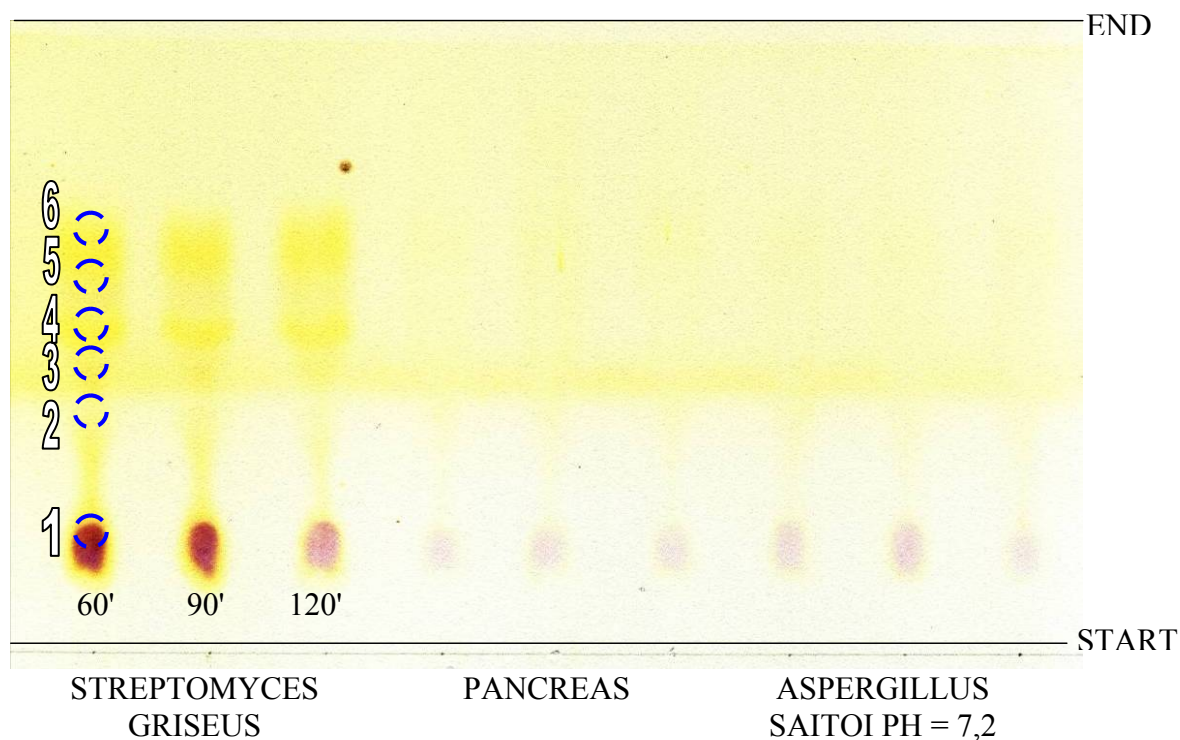
Byla zvolená tato mobilní fáze na základě výzkumu Mgr. Kateřiny Šandové (pedagogická fakulta, katedra chemie TUL), kde tato fáze vykazovala, pro účel tohoto experimentu, velmi dobré výsledky.

Experiment byl proveden podle následujícího postupu: na startovní linii od chromatografické desky (2  $\text{cm}$  od dolní hrany) bylo celkem nanášeno 9 vzorků hydrolyzátů (3 pro každý zkoušený enzym aplikovaný na vlnu po dobu 30, 90, 120 min). Byly také nanášeny standardy  $\alpha$  - aminokyselin, jako referenční hodnoty výsledků. Pomocí mikropipety byly nanášeny 3  $\mu\text{l}$  zkoumaného hydrolyzátu, následovalo sušení při laboratorních klimatických podmínkách. Tento proces se opakoval celkem 7 – krát, čili, celkový objem činil 21  $\mu\text{l}$ . Poté se každá deska (po dvou) vložila do chromatografické komory, kde již byla vložena mobilní fáze. Doba vyvíjení pro první desku činila 105  $\text{min}$  a 60  $\text{min}$  pro ty další (důvod: komora byla nasycená parami mobilní fáze). Dále se skleněné desky sušily v termostatu při 75°C (cca 30  $\text{min}$ ) a po jejich vychladnutí se postříkaly detekčním činidlem. Opět se vše vložilo do termostatu při 85°C. Obvykle se uvádí v literatuře [22], že detekční teplota by měla být okolo 105°C. Jelikož se používaly skleněné desky, tak tato teplota nemohla být aplikovaná, poněvadž by zapříčinila její možné prasknutí.

Skvrny, které se objevily na chromatografické desce, nebyly až tak markantní a tudíž, pro opakování experimentu, se doporučuje vyhodnocení výsledků pod UV zářičem. Pokud tento přístroj není k dispozici, tak se doporučuje co nejrychleji desky opatrně skenovat a následně upravit fotky pomocí příslušného softwaru

(např. Adobe® Photoshop®). Chromatogramy, včetně zjištěných hodnot  $R_f$  (retardation factor), jsou níže uvedeny.

## 5.4 CHROMATOGRAMY



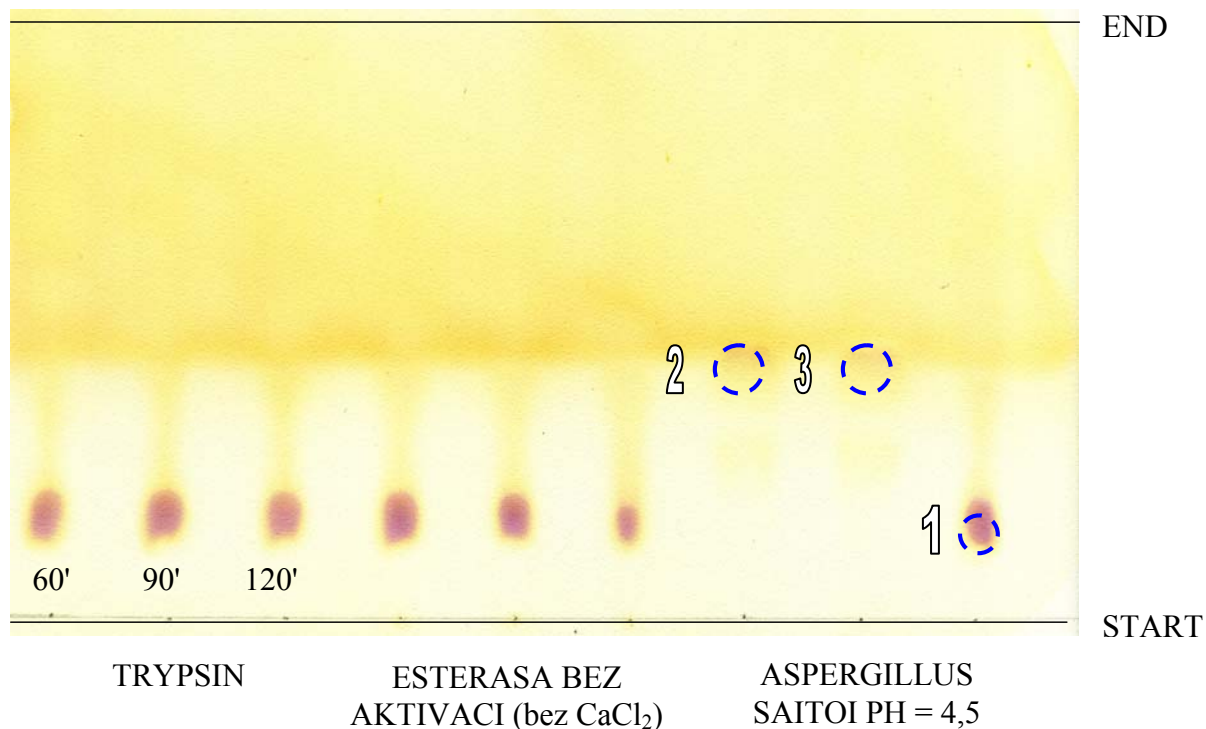
Obr. 23 – tenkovrstvá chromatografie hydrolyzátů vlny po aplikaci výše uvedených enzymů. Modré kruhy značí průběžné dělení aminokyselin obsažených v hydrolyzátech. V tab. xx jsou uvedené hodnoty  $R_f$  [22].

Hodnoty, které budou níže přiložené, jsou charakteristické pouze pro hydrolyzát vlny předupravený streptomycesem, poněvadž u ostatních vzorků nelze vizuálně identifikovat možné štěpy aminokyselin.

U téhož vzorku byly stanovené  $R_f$  hodnoty jenom pro 60 min. úpravy, neboť tyto hodnoty jsou totožné s hydrolyzátem pro 90 min. a 120 min. úpravy.

Skrvna č.	Hodnoty $R_f$	Odpovídající organická sloučenina (aminokyselina)
1	0,175	Glutamin
2	0,35	Prolin
3	0,4375	Tyrosin
4	0,5125	Tryptofan, methionin
5	0,575	Fenylalanin
6	0,65	Isoleucin

Tab. 11 – Hodnoty  $R_f$ .

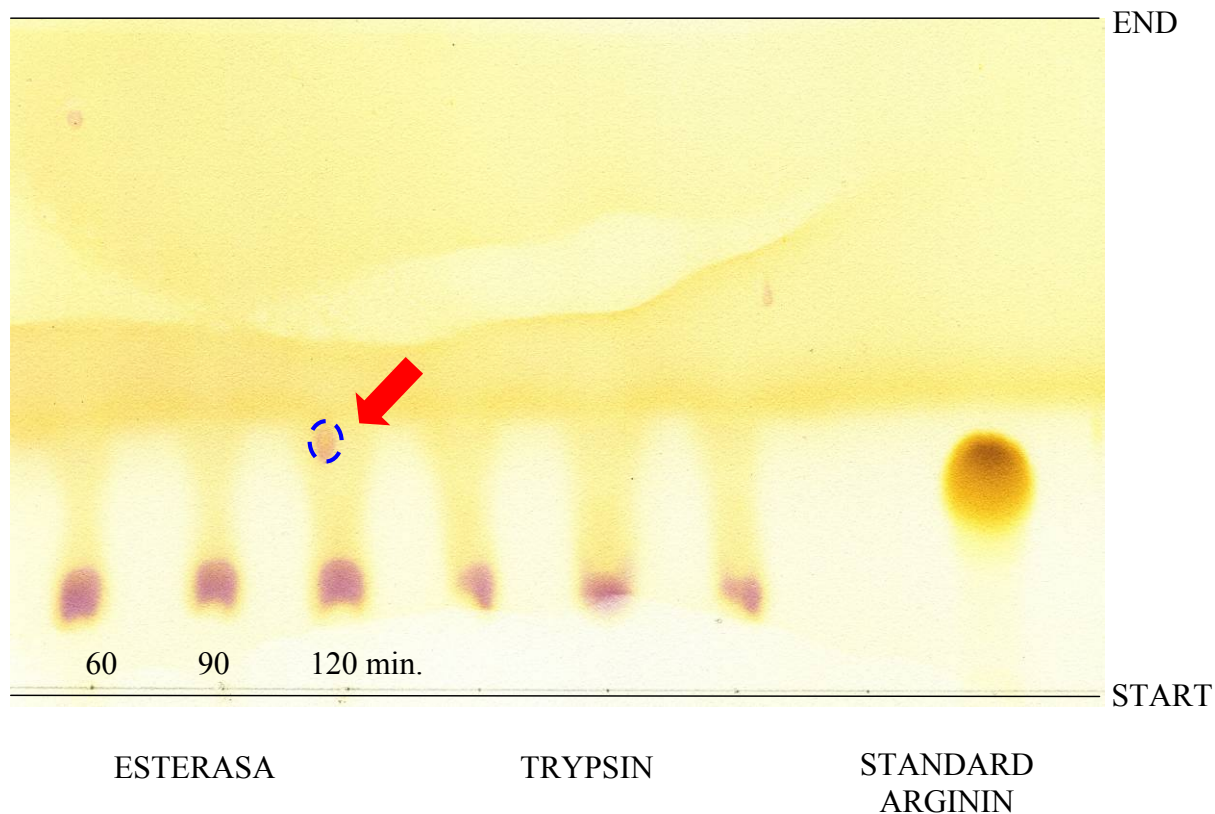


Obr. 24 – tenkovrstvá chromatografie hydrolyzátů vlny po aplikaci výše uvedených enzymů. Modré kruhy značí průběžné dělení aminokyselin obsažených v hydrolyzátech. V tab.12 jsou uvedené hodnoty  $R_f$  [22].

Na tomto obrázku je velmi zajímavé dělení skvrn hydrolyzátu vlny po úpravě aspergillusem, zejména u hydrolyzátů upravovaných po 60 min. a 90 min.. U ostatních vzorků nelze přesně identifikovat průběh dělení a skvrny nejsou jasné. Lze si všimnout, že pouze počáteční dělení je u všech zkoumaných vzorků výrazné a je ve stejné vzdálenosti od startu (skvrna č.1) viz tab 12.

Skvrna č.	Hodnoty $R_f$	Odpovídající organická sloučenina (aminokyselina)
1	0,15	<i>Arginin</i>
2	0,42	<i>Tyrosin</i>
3	0,42	<i>Tyrosin</i>

Tab. 12 – Hodnoty  $R_f$ .



Obr. 25 – tenkovrstevná chromatografie hydrolyzátů vlny po aplikaci výše uvedených enzymů. Modré kruhy značí průběžné dělení aminokyselin obsažených v hydrolyzátech.






U tohoto chromatogramu je zajímavá jedna zvláštní, malá a skoro nepatrná skvrna u hydrolyzátu vlny upravené esterazou (aktivované s  $\text{CaCl}_2$ ) po době 120 min.. Dle literatury [22], lze spekulovat o tom, že se jedná o štěp, při kterém se uvolnila aminokyselina *prolin* (hodnota  $R_f = 0,37$ ).

Na základě výsledků tohoto experimentu a výsledků z měření pevnosti a tažnosti, byly určeny vhodné kombinace zkoumaných enzymů [22].

## 6 Kombinace více enzymu

Na základě výsledků z měření pevnosti - prodloužení (viz. *Graf. – 5*) a úbytků hmotností (viz. *Graf. – 4*) bylo vybráno několik enzymů, jejichž kombinace by mohla dodat vlněnému vláknu zajímavé vlastnosti. Kombinací není myšleno, že dva či více enzymů reagují společně se vzorkem v jedné lázni, nýbrž jedná se o postupnou úpravu podle předem stanovené hierarchie. Kdyby se nepostupovalo tímto způsobem, nevyužily by se všechny účinky jednotlivých enzymů a to proto, že by si navzájem konkurovaly při obsazování aktivních míst v substrátu (vlňa), čili by se navzájem rušily. Nedocházelo by k synergickému efektu.

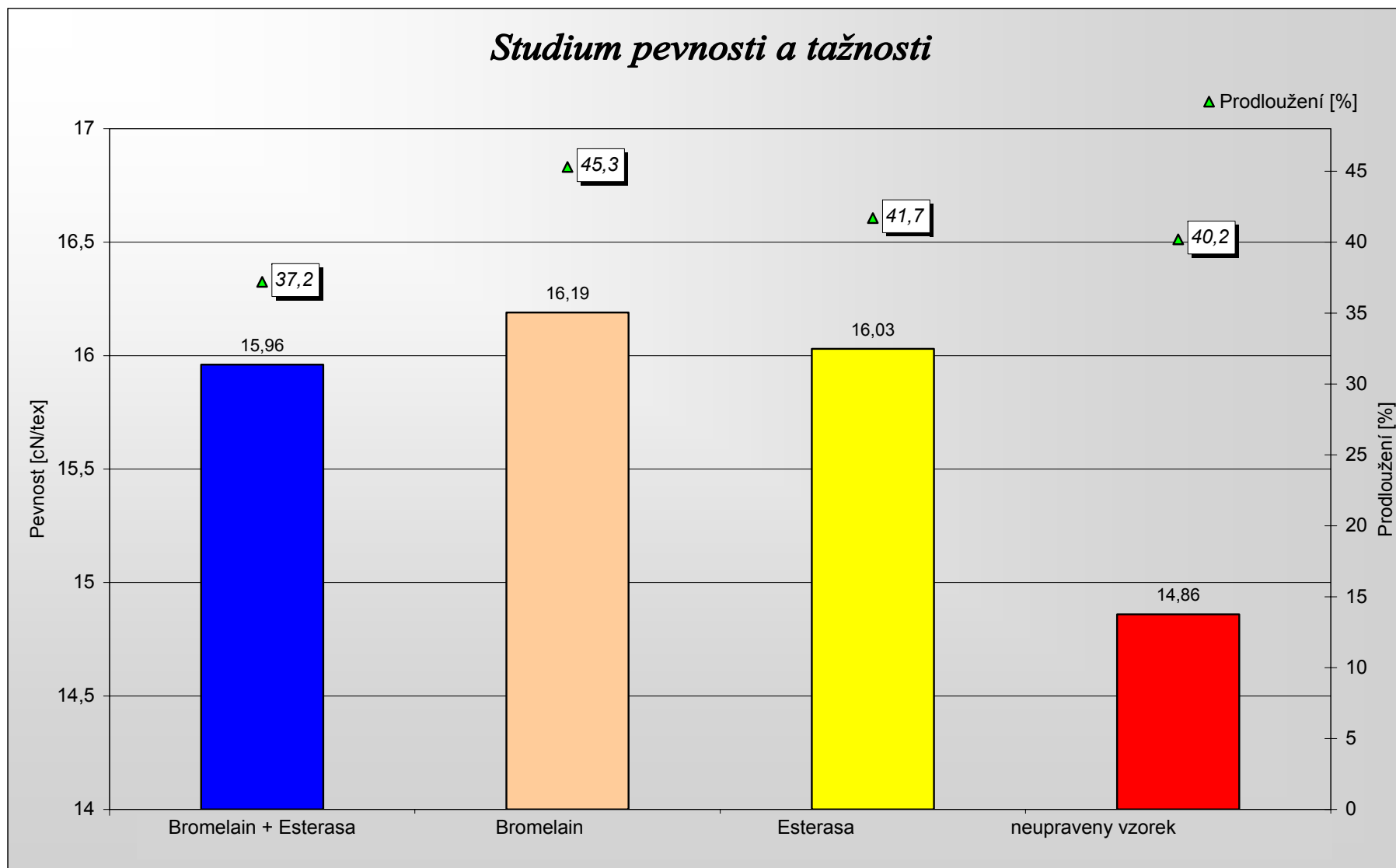
K této části experimentu byly vybrány tyto enzymy:

-  *Bromelain*;
-  *Esterasa*;
-  *Aspergillus saitoi*;
-  *Bacillus polymyxa*;
-   $\alpha$  – *chymotrypsin*.

Kombinace pak vypadala následovně:

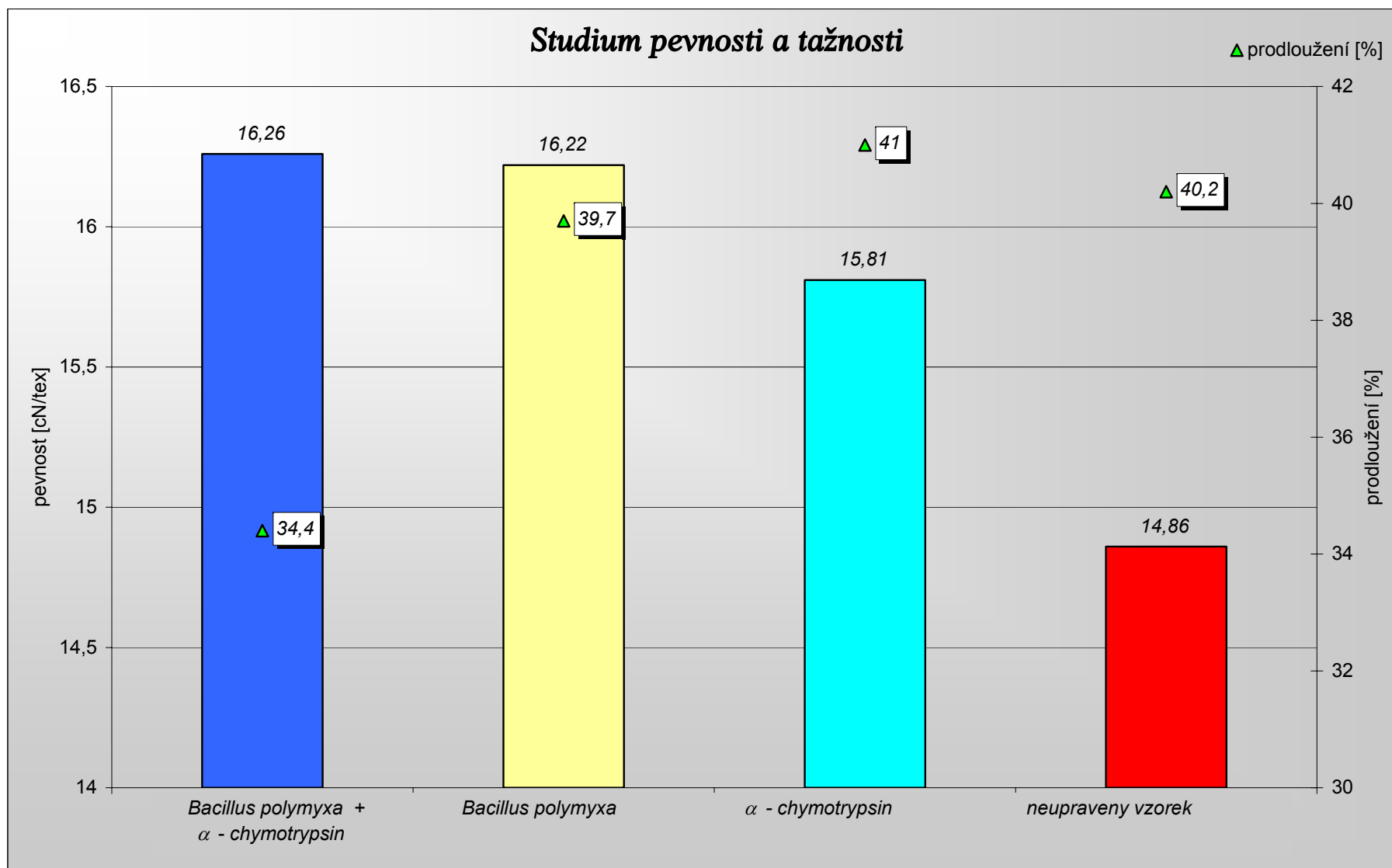
- 1./ *Bromelain* + *Esterasa* (1 ml DMF, pH = 7,2 pomocí  $\text{PO}_4^{4-}$ );
- 2./ *Bromelain* + *Esterasa* + *Aspergillus saitoi* (u *aspergillus saitoi* se pak pH upravilo na pH = 4,5 pomocí  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ );
- 3./  $\alpha$  – *chymotrypsin* + *bacillus polymyxa* (0,5 ml DMF, pH = 7,2 pomocí  $\text{PO}_4^{4-}$ )

Čas úpravy byl ponechán jako v předešlých experimentech, čili 120 min pro každý aplikovaný enzym (*kap. 5.1*). Výjimkou byla poslední dvojice, kde se zvolil nižší čas a to 90 min. To vyplývá ze studie pevnosti a prodloužení, která je zahrnutá v *Grafu 5*. Lze si všimnout, že největší aktivita těchto enzymů je při předem zmíněném čase (*bacillus polymyxa* dle grafu má sice největší aktivitu při 60 min., ale její pokles při 90 min. není až tak relevantní). Níže, v grafické formě, jsou uvedeny výsledky tohoto experimentu.

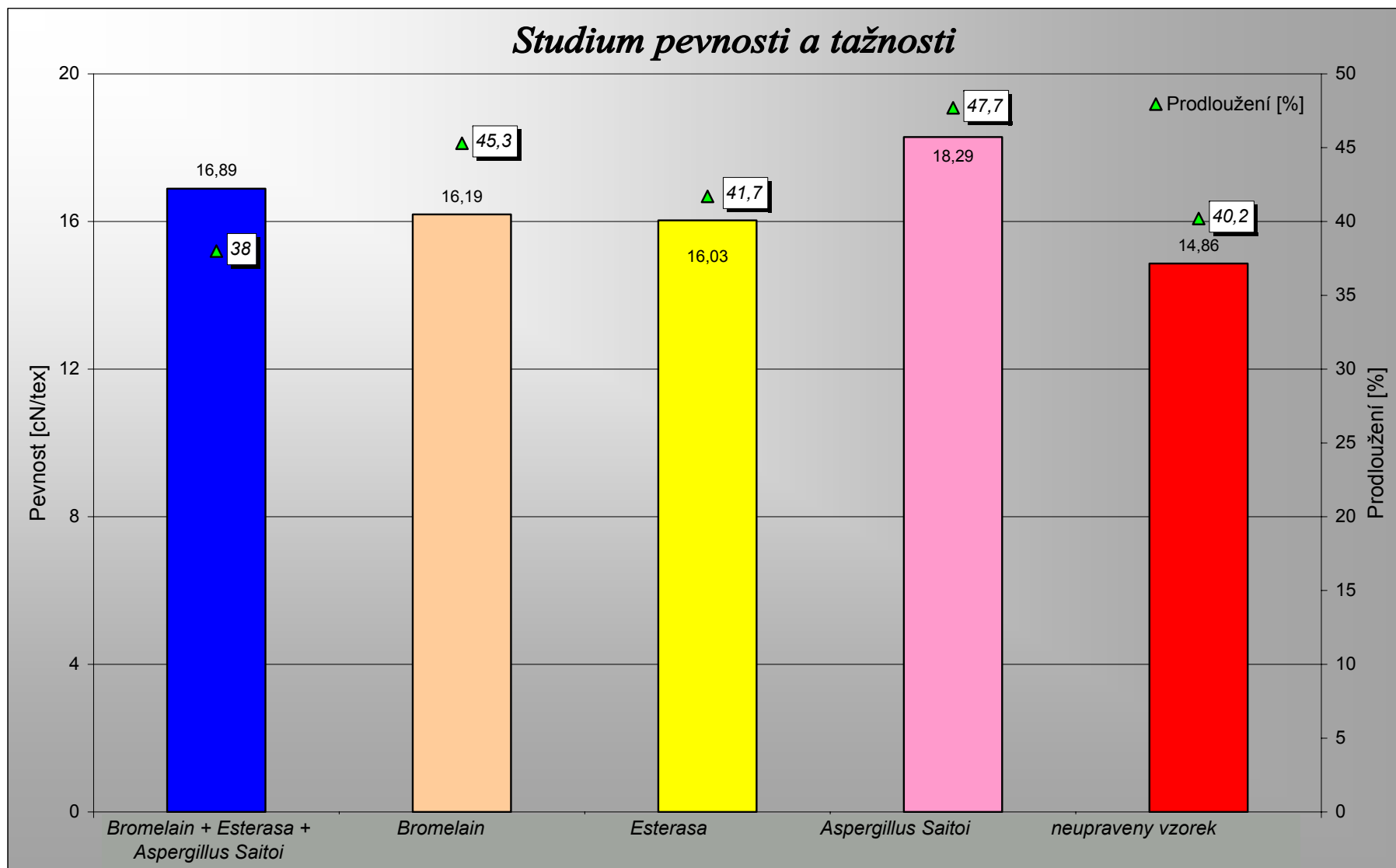


Graf. 8 – závislost pevnosti a tažnosti vlněných vláken po enzymatické úpravě (kombinace) v porovnání s neupraveným vzorkem.





Graf. 9 – závislost pevnosti a tažnosti vlněných vláken po enzymatické úpravě (kombinace) v porovnání s neupraveným vzorkem



Graf. 10 – závislost pevnosti a tažnosti vlněných vláken po enzymatické úpravě (kombinace) v porovnání s neupraveným vzorkem

Postup experimentu byl totožný, jak již bylo uvedeno v *kap. 5*, čili dodržovaly se všechny parametry potřebné pro reálnou konfrontaci mezi metodikou preferující aplikaci jednoho enzymu a metodikou založenou na kombinaci více enzymů. Inkubační teplota byla opět nastavena na 33,1 °C a úprava se prováděla za občasného míchání.

Opět byla zvolena koncentrace jednotlivých enzymů na 1 g/l. V níže přiložené tabulce (*tab. 11*) jsou znázorněny hodnoty úbytku hmotnosti.

Doporučuje se konfrontace těchto hodnot a hodnoty zobrazené v *Tab. 10*, které budou centrem diskuze v závěru.

Kombinace ENZYMU	pH	Aktivátor	Organické rozpouštědlo	Úbytek hmotnosti (celkový) v [%]
<i>Bromelain + Esterasa</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	DMF (0,5 ml)-	8,18
<i>Bromelain + Esterasa + Aspergillus saitoi</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ ) pro první dva enzymy pak pH = 4,5 ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ )	-	DMF (0,5ml) pouze při úpravě prvních dvou enzymů.	9,07
$\alpha$ - chymotrypsin + <i>Bacillus polymyxa</i>	7,2( $\text{PO}_4^{3-}$ )	-	DMF (0,5ml)	6,23

Tab. 12 – složení lázně a hodnoty úbytků hmotností při úpravě vlněného vlákna enzymatickou kombinací.

## 7 Stanovení obsahu cysteinu (cystinu) a dalších aminokyselin




Jak už bylo řečeno v [kap1.2.1](#), aminokyselina cystein je příčinou cystinových můstku, tj. příčné kovalentní vazby mezi dvěma atomy síry, které v makromolekule keratinu hrají nezbytnou roli při mechanickém namáhání. Zdravé vlněné vlákno obsahuje cca 10 – 11% této aminokyseliny, poškozené o cca 2 – 3% méně. Při kyselé hydrolýze se vlněné vlákno rozloží na monopeptidy a dipetidy a tento hydrolyzát lze použít pro detekci cysteinu a jiné další důležité aminokyseliny. Míru obsahu cysteinu lze i detekovat při enzymatické úpravě vlny a při jejím chlorování, kde keratin podléhá biochemickému a oxidačnímu poškození. Je nutno říci, že enzymatickou úpravou, resp. limitovanou proteolýzou, se dokáže s vysokým úspěchem ovlivnit míra poškození vlněného vlákna, poněvadž lze modifikovat parametry, které ovlivňují enzymatickou aktivitu (*pH, inkubační doba, teplota a také za pomoci specifických inhibitorů*).

Ke stanovení obsahu cysteinu v hydrolyzátech lze využít buď klasické metody, ke kterým patří reakce s Follynovým činidlem (titrace) [18] nebo použití moderní technologie, v níž lze citovat chromatografické metody a neprozkoumanou IR spektroskopii.

V této diplomové práci k detekci výše zmíněné aminokyseliny byla použita tato poslední metoda a to zejména blízká infračervená spektroskopie.

### 7.1 IR spektroskopie

IR spektroskopie je založena na absorpci světla molekulami, přesněji sloučeninami, při vlnové délce mezi  $0,78\ \mu\text{m}$  (horní mez viditelné oblasti) a  $100\ \mu\text{m}$ . Tato velmi široká oblast je rozdělená do tří oblastí.

-  **IR blízká** (NIR, *Near InfraRed*) od  $0,78$  do  $2,5\ \mu\text{m}$ , tj. od  $13\ 000$  do  $4000\ \text{cm}^{-1}$ ;
-  **IR střední** (MIR, *Mid InfraRed*) od  $2,5$  do  $50\ \mu\text{m}$ , tj. od  $4000$  do  $200\ \text{cm}^{-1}$  ;
-  **IR daleká** (FIR, *Far InfraRed*) od  $50$  do  $100\ \mu\text{m}$ , tj. od  $200$  do  $10\ \text{cm}^{-1}$

Z analytického hlediska je nejzajímavější střední infračervená oblast, která poskytuje informace o struktuře organických sloučenin. Blízká infračervená oblast je používána pro některé analýzy organických sloučenin, především v potravinářském

průmyslu, ale není tak používaná jako MIR, poněvadž je poněkud složitější, zvláště co se týká identifikace píků a technologie přístrojů. Poslední oblast FIR představuje málo užitečných píků pro identifikace organických sloučenin, ale je velmi užitečná pro identifikace anorganických a metalorganických sloučenin [23].

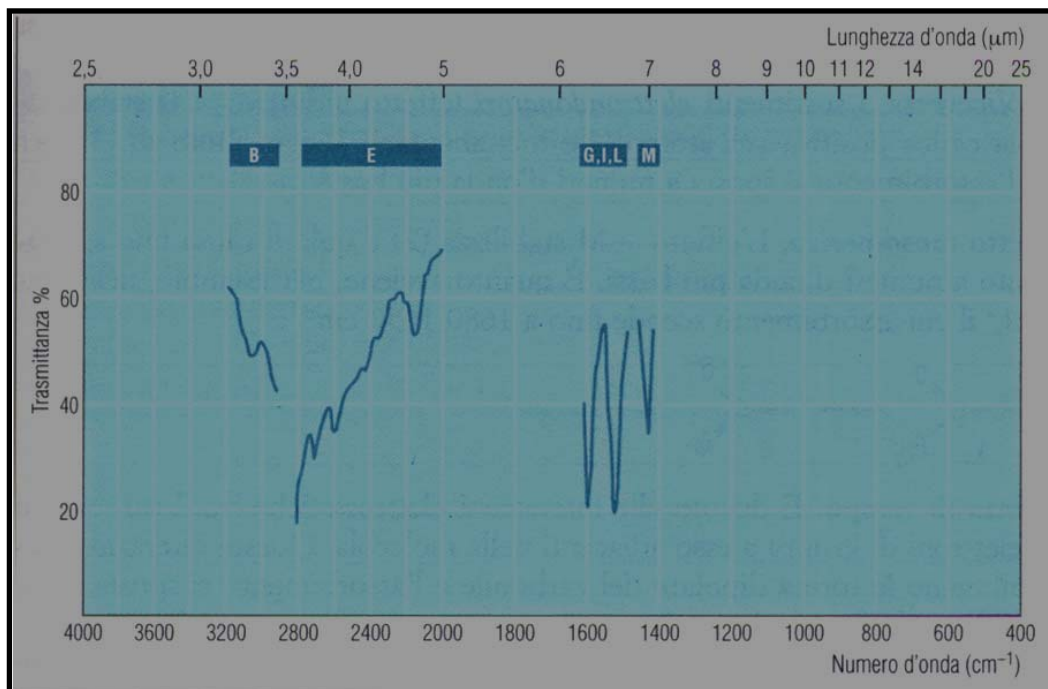
## 7.2 Specifické píky pro identifikace aminokyselin

V následující tabulce (Tab.13), budou znázorněny hodnoty vlnočtu tykající se valenčních vibrací atomu a molekul potřebných pro identifikaci aminokyselin.

	$\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )	Intenzita /pásma	Charakteristické pásma pro
<b>A</b>	3500 – 3250	1-2 pásma střední	$\nu(\text{N-H})$ z $\text{R-NH}_2$ a z $\text{R}_2\text{-NH}$
<b>B</b>	3350 – 2350	silná/široké	$\nu(\text{O-H})$ a $\nu(\text{N-H})$ z $\text{NH}_3^+$
<b>C</b>	3150 – 2600	silná/široké	$\nu(\text{N-H})$ z $-\text{NH}_3^+$ a z $-\text{NH}_2^+$
<b>D</b>	2700 – 2250	střední/široké	$\nu(\text{N-H})$ z $-\text{NH}^+$
<b>E</b>	2800 – 2000	série středních a slabých pásem	deformace z $-\text{NH}_3^+$ spojené s C
<b>F</b>	1750 – 1750	silná	$\nu(\text{C=O})$ z $-\text{COOH}$
<b>G</b>	1660 – 1580	střední/úzké	$\delta_{\text{as}}(\text{N-H})$ z $-\text{NH}_3^+$
<b>H</b>	1640 – 1560	silná/střední	$\delta(\text{N-H})$ z $-\text{NH}_2$ a z $-\text{NH}_2^+$
<b>I</b>	1600 – 1560	silná	$\nu_{\text{as}}(-\text{COO}^-)$
<b>L</b>	1550 – 1485	silná/střední	$\delta_{\text{sim}}(\text{N-H})$ z $-\text{NH}_3^+$
<b>M</b>	1400	střední/slabé	$\nu_{\text{sim}}(-\text{COO}^-)$
<b>N</b>	1440 – 1395	střední	$\delta(\text{C-O-H})$
<b>O</b>	1320 – 1210	silná/střední	$\nu(\text{C-O})$
<b>P</b>	1330 – 1100	střední	$\rho(\text{N-H})$ z $\text{NH}_3^+$

Tab. 13 – identifikační pásma pro aminokyseliny a jejich soli.

V následujícím grafu (Graf. 8) budou tato pásma znázorněné.



Graf. 11 – charakteristické vibrační pásma pro identifikace  $\alpha$  - aminokyselin.

### 7.3 Příprava vzorků a jejich analýza

Po enzymatické úpravě se vzorky z lázně odebraly do laboratorní zkušavky se závěrem, cca 10 ml hydrolyzátu a to pro každý enzym nejméně třikrát (úprava po 60 min, 90 a 120 min). Tyto vzorky se pak daly zmrazit (konzervace) a posléze, ve formě tekutiny, se zkusily analyzovat na IR spektroskopu fy Perkin Elmer, metodou ATR.

Metoda zeslabené totální reflexe ATR (attenuated total reflectance) je vhodná pro silně absorbující kapalně a viskózní vzorky, pasty, gely, polymerní vrstvy i práškové vzorky. Její podstatou je totální vnitřní reflexe IR záření po průchodu hranolem o velkém indexu lomu. Ve vzorku, který je v těsném kontaktu s krystalem, na kterém měříme (v tomto případě krystal ze selenidu zinečnatého (ZnSe) ), vzniká při totálním odrazu na rozhraní opticky hustšího prostředí (krystal) s prostředím opticky řidším (vzorek) tzv. evanescentní vlna v oblasti absorpce, která umožňuje zkoumat i silně absorbující vzorky

Pro ATR metodu platí, že úhel dopadu paprsku na vzorek musí být větší než je kritický úhel pro dosažení totální reflexe. Tento úhel také určuje počet odrazů v krystalu a ovlivňuje i hloubku průniku. Jelikož rychlost evanescentní vlny velmi rychle klesá,

musí být zajištěn těsný kontakt vzorku s krystalem. Zpravidla se vzorek přitlačuje ke krystalu speciálním nástavcem.

Jelikož odpařování značného procenta vody za účelem zjištění obsahu hydrolyzátů se nepodařilo uskutečnit (ZnSe deska se nesmí ohřát nad 40°C, jinak by se nevratně poškodila), i když tyto vzorky byly ponechány týden v silikagelu, nebylo možné dále pokračovat v měření (molekula H<sub>2</sub>O zkresluje výsledky kvůli vibraci - OH skupin).

Vyskytl se problém, jak vysušit vzorky hydrolyzátu aniž by se poškodily a jak následně zvýšit koncentrace předpokládaných aminokyselin. Pokud je to možné, tak se doporučuje liofilizovat vzorky, aby se obdržel jemný prášek. V tomto experimentu, bohužel toto nebylo uskutečnitelné. Přesto se našlo podobné řešení, které umožnilo měření provést.

Použily se chromatografické desky s mikrocelulózy, jež byly používány v chromatografii hydrolyzátů (kap.5.3). Na novou desku se nanášely vzorky hydrolyzátů (postupně všech 10 ml) a po jejich odpaření se opatrně seškrábal jejich povrch. Takto upravené vzorky obsahovaly jak krystalickou mikrocelulózu, tak i předpokládané aminokyseliny dehydratované. Pak se připravila kalibrační řada pro jednotlivé zkoumané vzorky tak, aby se dokázalo kvantifikovat zastoupení  $\alpha$  - aminokyselin ve vzorcích [24].

### 7.3.1 Stanovení obsahu cystinu (cysteinu).

Kalibrační řada byla následující:

	L – cystin [%]	Obsah mikrocelulózy [mg]	Obsah čistého L - cystin [mg]
1	1	98,8	1,2
2	2	97,5	2,5
3	4	95,7	4,3
4	6	6,3	95,7
5	8	8,4	91,6
6	10	9,4	90,4

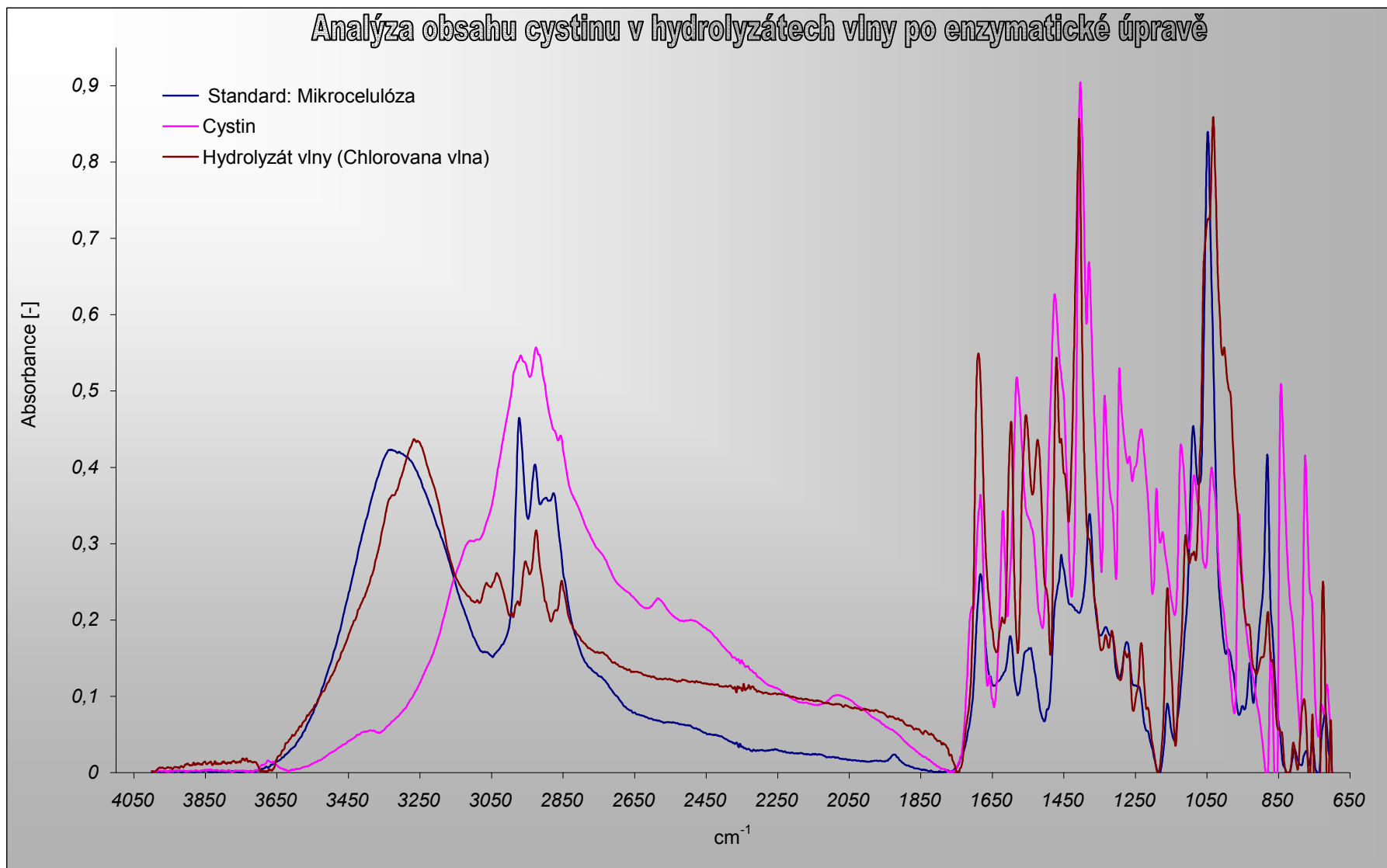
Tab.14 – kalibrační řada čistého vzorku L – cystinu.

Takto připravené vzorky byly rozpuštěny v koncentrovaném ethanolu ( $C_2H_5OH$ ). Aby se zajistila téměř dokonalá rozpustnost, tak se vzorky (ve zkumavce) vložily do ultrazvukové lázně.

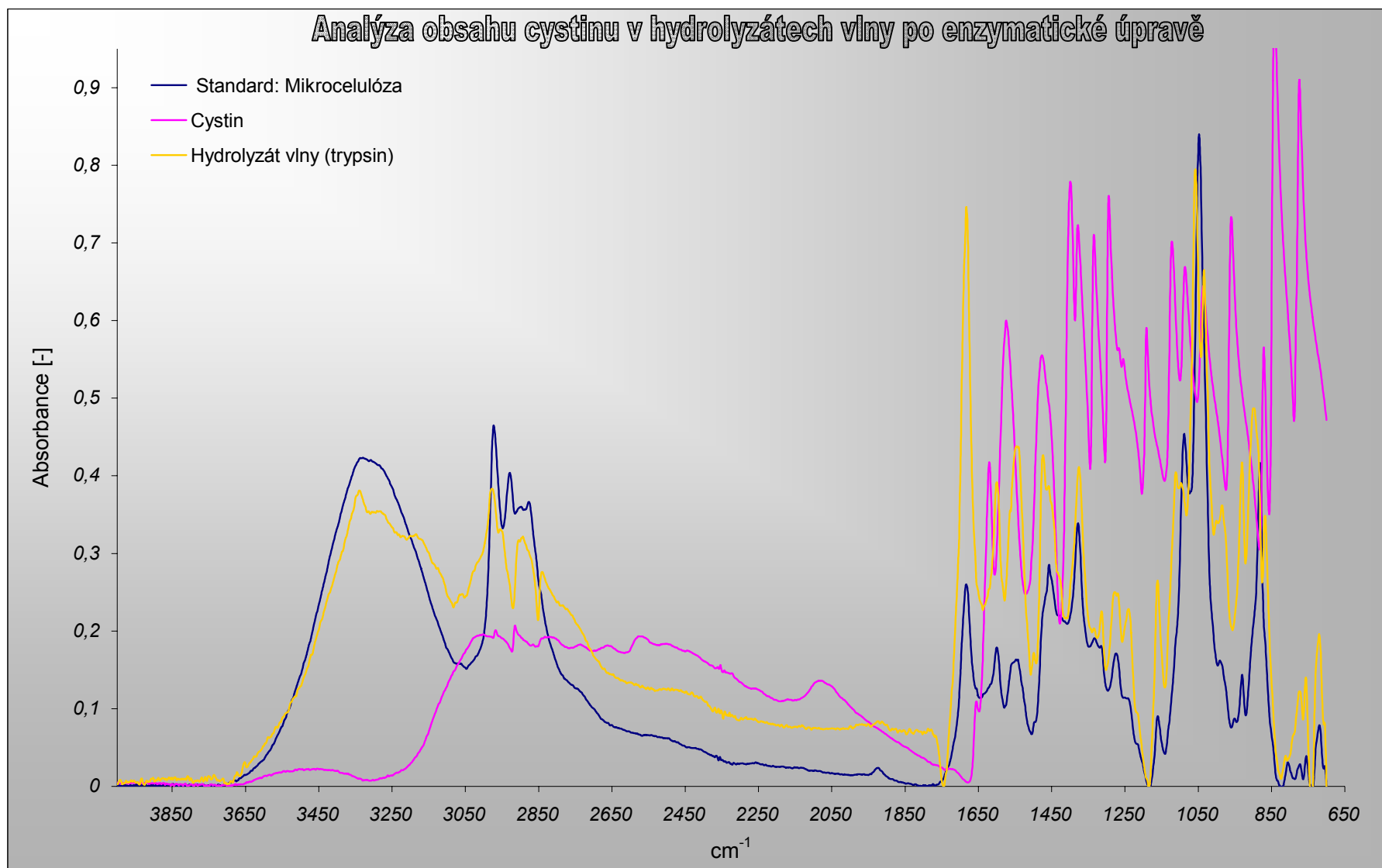
Zhotovený preparát se pak vylil na měřicí krystal (ZnSe) a před měřením se nechalo odpařovat rozpouštědlo při pokojové teplotě. Tento proces je nezbytný, aby se vytvořila jemná vrstvička prášku po celé ploše krystalu, která by měla zajistit totální reflexi paprsku.

Po změření všech vzorků z kalibrační řady se analyzovaly vzorky hydrolyzátů. Výsledky jsou znázorněny v těchto grafech. Jako ukázkové grafy se zvolily vzorky hydrolyzátů z chlorované vlny a vlna upravená enzymem trypsin. Než čtenář začne analyzovat tyto grafy je nutno říci, že výsledky tohoto experimentu nevyšly dle očekávání a tudíž nebylo možné stanovit přesně množství jednotlivých aminokyselin v hydrolyzátech. Důvody budou popsány v závěru. Další grafy týkající se tohoto experimentu budou uvedeny v příloze.





Graf. – 12. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po jejím chlorování.



Graf. –13. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po úpravě trypsinem.

## 7.4 Studium omaku

Omak, jakožto subjektivní vjem lze těžko klasifikovat a hodnotit a tudíž nelze objektivně říci zda ten, či onen materiál je v uvozovkách lepší nebo horší. Na druhou stranu všichni lidé, kteří se zabývají textilem, počínaje technology ve výrobě, konče konečnými zákazníky, vědí, že právě omak hraje rozhodující roli při výběru předloženého zboží.

Níže bude uvedena krátká studie tohoto vjemu, kde skupina 10 – ti uchazečů se podrobila nenáročnému testu. Tito lidé byli vybráni mezi zdejšími studenty (5 žen a 5 mužů) textilní fakulty a měli za úkol porovnat enzymaticky upravené vzorky vůči předloženému standardu (neupravená vlna, pouze vypraná). Uchazeči mohli vyjádřit své vjemy pomocí 5 – ti stupňové škály od nejlepšího k nejhoršímu, přičemž střed této škály, čili 3, byl tzv. neutrální neboli referenční bod (standard).

Byl zvolen tak nízký počet uchazečů, protože více násobné ohmatávání vzorku zkresluje celkový výsledek důsledkem přenášení lidského tuku z povrchu ruky do vlněného materiálu [25].

Zajímavý nebyl pouze výzkum, zda vzorky upravené pomocí enzymů zlepšily nebo zhoršily omak vlněných vláken, ale také, jak se ženské vnímání omaků lišilo vůči mužskému.

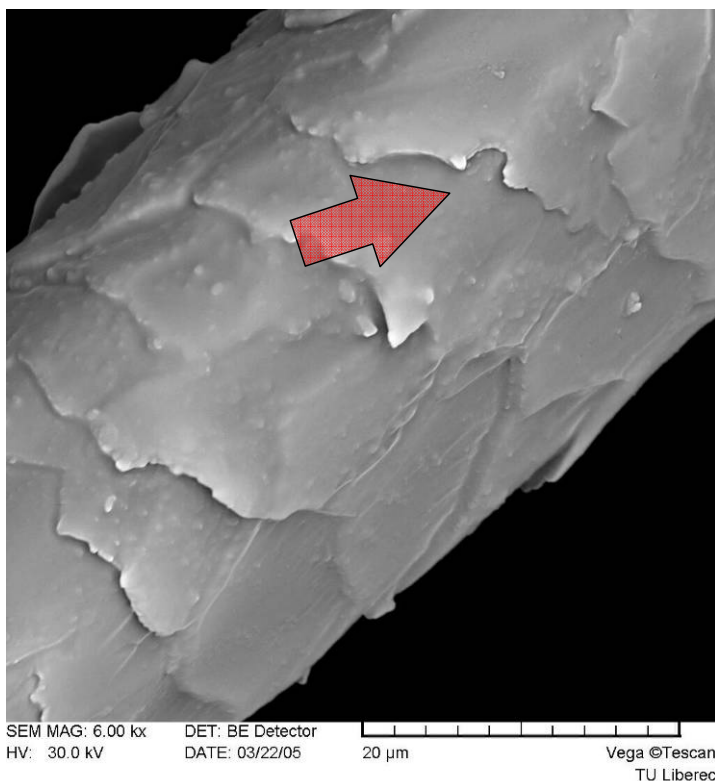
V *tab. 15* na následující stránce budou znázorněny výsledky tohoto výzkumu, kde se uvádějí jednotlivá hodnocení: průměr ( $\bar{x}$ ) a modus ( $\hat{x}$ ).

<i>Studium omaku</i>																		
	NaClO			Esterasa			Aspergillus saitoi			Pankreas			Trypsin (aktivace + CaCl <sub>2</sub> )			Trypsin		
<i>pohlaví</i>	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.
M	2	1,5	2,5	1,5	3	3	2	3	2,5	2,5	2,5	2,5	3	2,5	2	2	2	2
Ž	3	2	2	1	4	4	1,5	3	2	1	2,5	4	1,5	2	2,5	1	2	3
Ž	4	2	1	3	3	4	1	3	3,5	1,5	2	4	3	2	2	1,5	2	3
Ž	4	2	2	1,5	3	3	2,5	2	3	2,5	3	3	3	2,5	3	1,5	2	3,5
M	2,5	1,5	2,5	3	3	3,5	2	3	3,5	2	2	3	1,5	2,5	3	3,5	2,5	3
M	3,5	1	2,5	4	3	4	2	2	4	2	2	2	3,5	2	3	2	1	3
M	3	2	2	3	3,5	3,5	2	4	2,5	2	3,5	2	3	3	2	3	1	4
Ž	3,5	1	1,5	3,5	3	4	1	2	2,5	2	2,5	2,5	2	3	2,5	2,5	3,5	3
Ž	3,5	1	3	3	3,5	3,5	1,5	4	2,5	2,5	3	2	3	3	3	2	3	3
M	4	1	1	3	3,5	4	1,5	4	2,5	2,5	2	2,5	3	3	4	3,5	2,5	3
$\bar{x}$	3,5	1,5	2	2,5	3	3,5	1,5	3	3	2	2,5	3	2,5	2,5	3	2	2	3
$\hat{x}$	4	2	2,5	3	3	4	2	3	2,5	2,5	2	2,5	3	3	3	2	2	3
	Bacillus polymyxa			Bromelain			$\alpha$ - chymotrypsin			Strptomyces griseus			Bacillus polymyxa + $\alpha$ - chymotrypsin			Bromelain + Esterasa + Aspergillus		
<i>pohlaví</i>	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.	60 min.	90 min.	120 min.	90+ 90 min.			120 + 120 +120 min.		
M	2,5	2	2	2,5	3	2	3	3	2	2,5	2,5	2,5	1,5			1		
Ž	1,5	1,5	3	1	1,5	4	1,5	2,5	2	1	2	4	2			2,5		
Ž	1	1,5	3,5	1,5	1,5	3	3	2	3	1,5	1,5	4	3			2		
Ž	2	2	3,5	1,5	2	4	2	2,5	4	2	2	3,5	4			3,5		
M	2	2	3,5	3	2,5	4	3	3	2	3	2,5	2	1,5			2		
M	3,5	1	2	4	3	2	4	2	2	3,5	3	4	2			3		
M	3	3,5	5	4	4	4,5	3	4	1,5	3	3,5	4	2,5			4		
Ž	2,5	2	3	2	3	3	2,5	2,5	2,5	3	3	2,5	3,5			2		
Ž	3,5	2	4	2,5	2,5	2,5	4	4	1,5	3	3	3,5	2			2		
M	2	2	3,5	2	2	3	3	4	3	3	2	3	2,5			2		
$\bar{x}$	2,5	2	3,5	2,5	2,5	3	3	3	2,5	2,5	2,5	3,5	2,5			2,5		
$\hat{x}$	2	2	3,5	2,5	3	4	3	2,5	2	3	2	4	2			2		

Tab. 15 – výsledky studie omaku enzymatických a chlorovaných vzorků při různých časech.

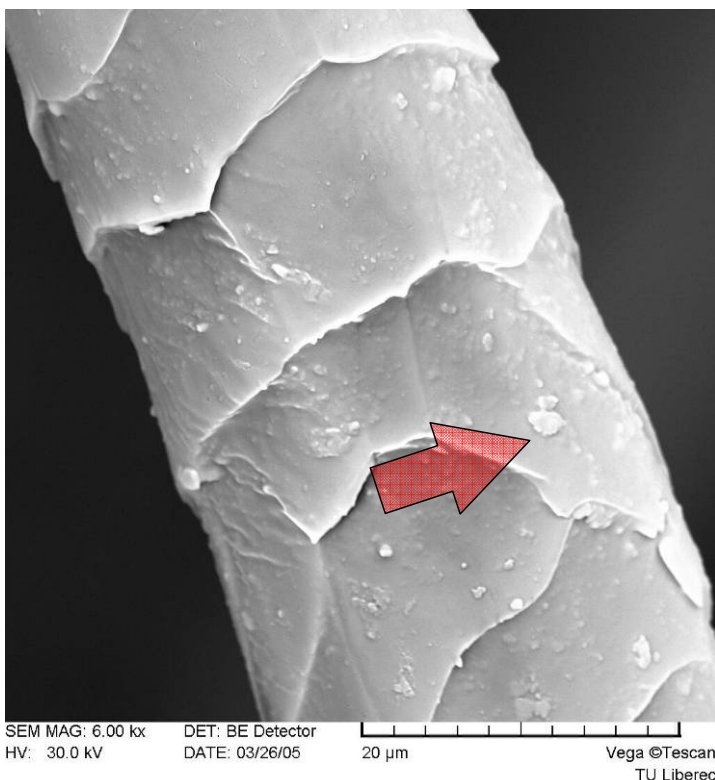
## 8 Obrazová dokumentace

Následující obrazová dokumentace zobrazuje vlněná vlákna po enzymatické a chlornanové úpravě, byla pořízena na rastrovacím elektronovém mikroskopu. Tento přístroj se nachází na KTM fakulty textilní Technické univerzity v Liberci.



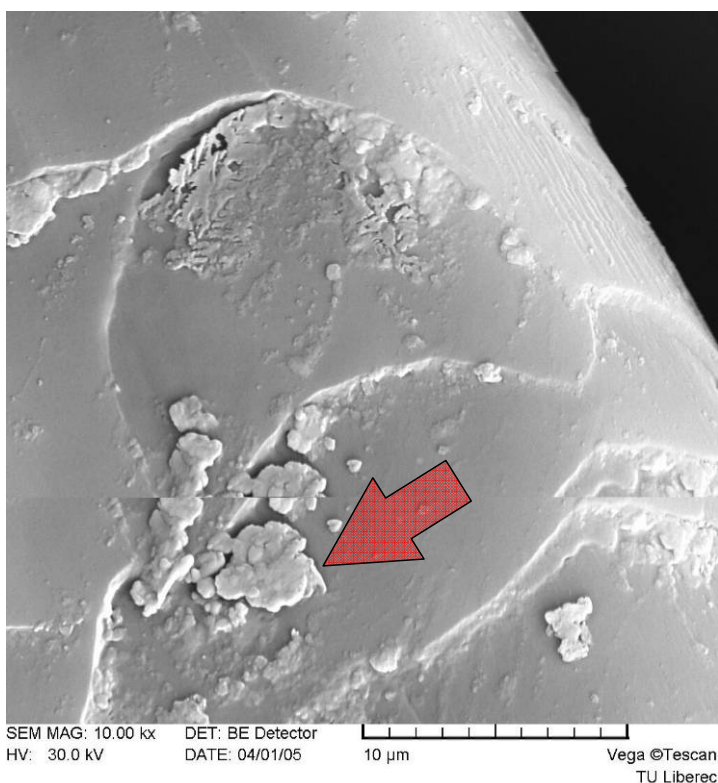
Obr. 26 – ***Chlorovaná vlna***

Na tomto snímku si lze všimnout, jak se aktivní kyslík, uvolněn rozkladem kyseliny chlorné, atakuje na vnější vrstvu šupinek. Jedná se o nehomogenní úpravu a to vytváří pilkovitý tvar těchto šupinek (viz. červená šipka).



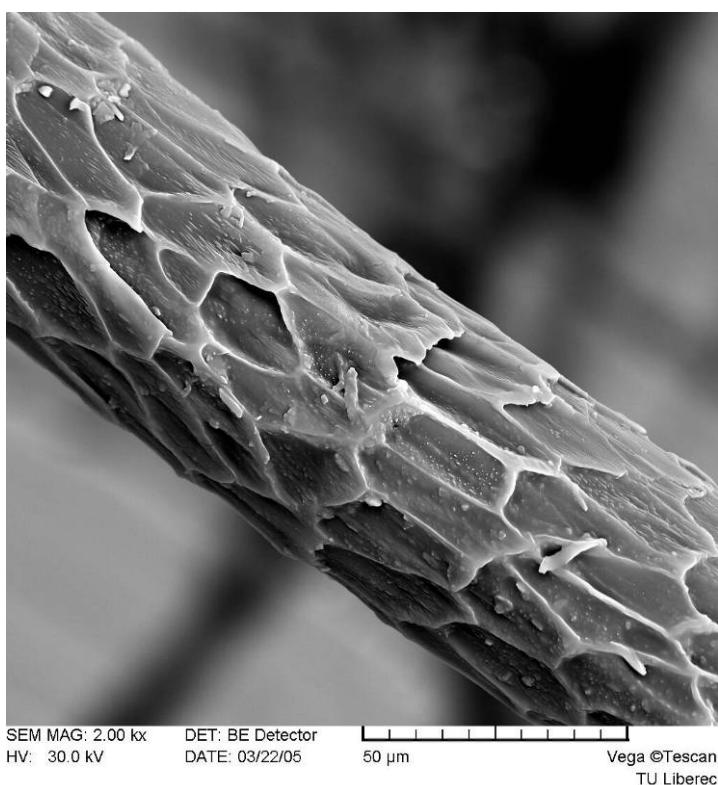
Obr. 27 –  ***$\alpha$  – chymotrypsin.***

Na rozdíl od předcházejícího snímku, je zde povrch vlněného vlákna homogenně upravený. Šupinky nevyčnívají od povrchu, jejich hranice jsou hladké a rovnoměrně zaoblené. Lze si všimnout, že v několika místech jsou přítomny zbytky epikutikuly po enzymatické digesce (viz. červená šipka).



Obr. 28 – *Bromelain*.

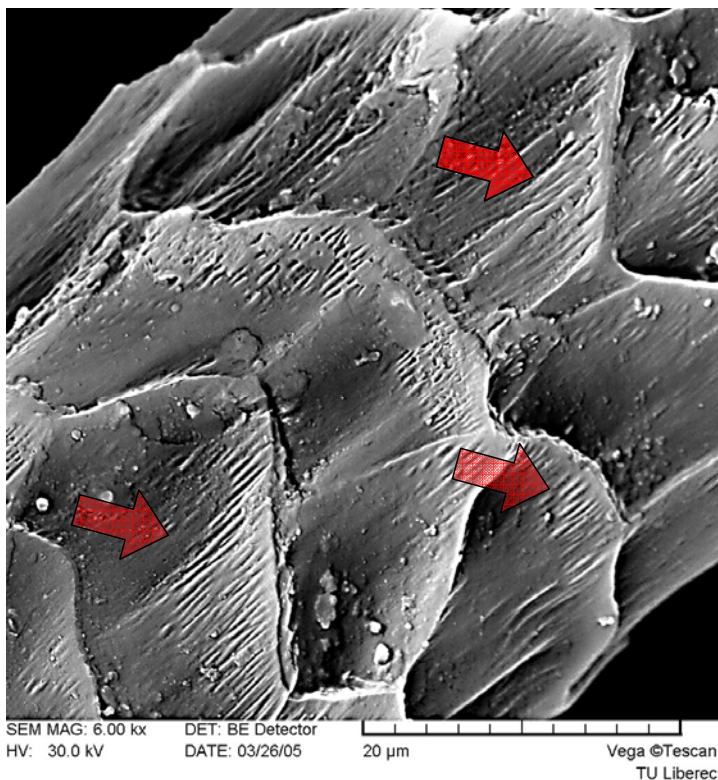
Tento enzym, ze všech zkoumaných enzymů, byl nejšetrnější vůči vlněnému substrátu (viz hodnoty úbytků hmotnosti v *kap.5.1*). Šupinky jsou dokonale zaoblené a celý povrch je téměř hladký bez výstupků. I zde na několika místech povrchu lze pozorovat zbytky šupin po enzymatické katalýze.



Obr. 29 – *Bacillus polymyxa*.

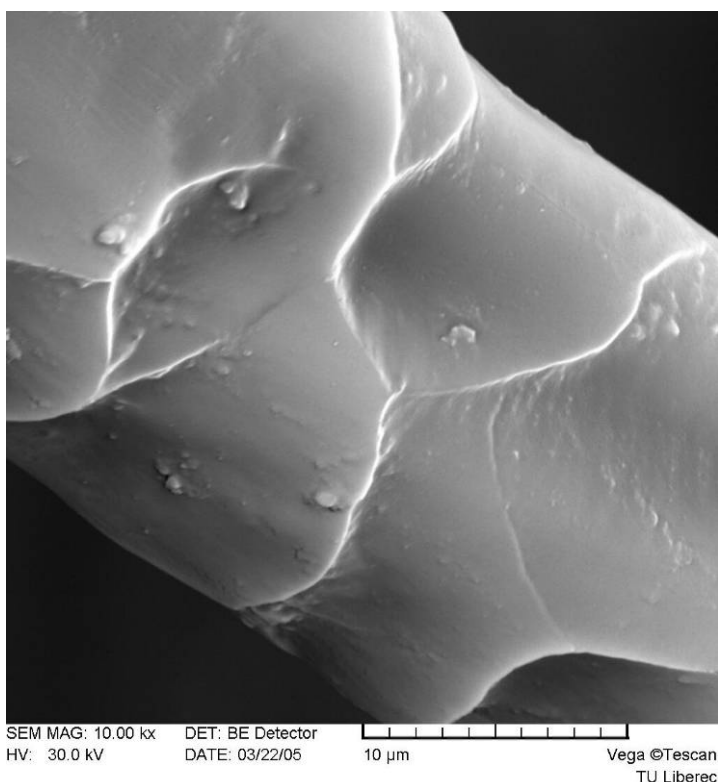
Nejdrastičtější ze všech aplikovaných enzymů na vlněném substrátu byl určitě *bacillus polymyxa* který, jak si lze všimnout, atakoval do značné hloubky povrch vlákna. Ze šupinek zůstaly pouze jejich hranice a vnitřek byl selektivně odstraněn. Lze dodat, že vlákna v takovémto stavu nelze pro textilní účely použít. Je nutné ovšem dodat, že pokud by tento enzym byl nadále zkoumán, je nutné buď snížit koncentraci enzymu nebo snížit dobu enzymatické digesce.





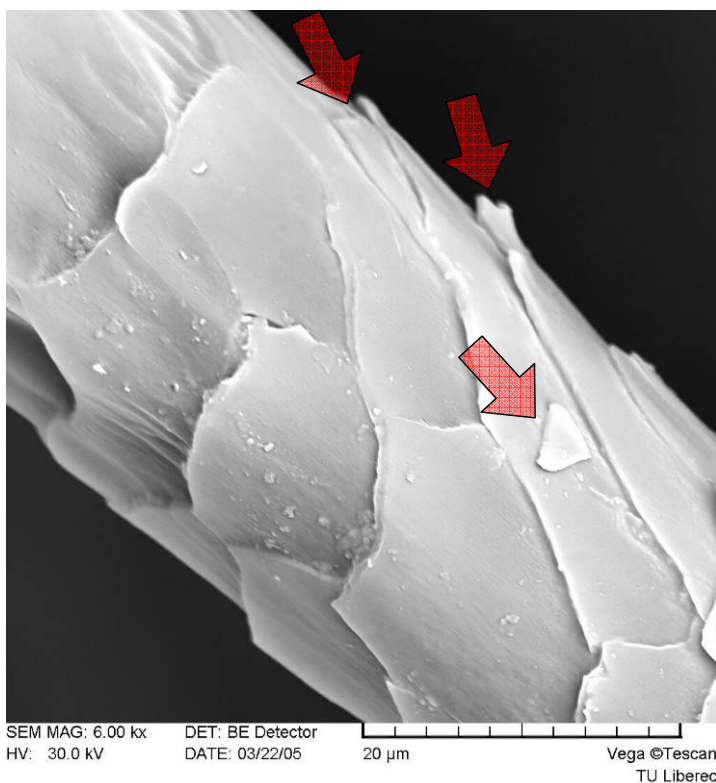
Obr. 30 – *Trypsin*.

Na tomto snímku lze pozorovat, jak proběhnul enzymatický útok. Lze vidět směr enzymatického útoku (od kořínku ke špičce) i pozici útoku. Enzym se selektivně zaměřoval na vnitřek šupinek, přičemž jejich vnější části byly nedotčeny. I zde takto upravené vlákno by těžko splňovalo zpracovatelské požadavky.



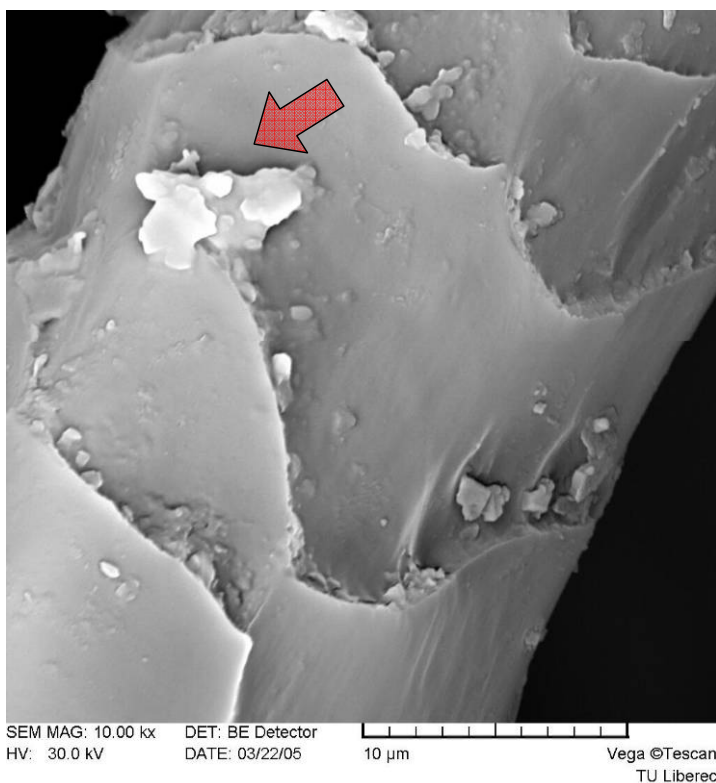
Obr. 30 – *Aspergillus saitoi*.

Na vedlejším snímku je znatelná úprava o vysoké kvalitě. Šupinky nevyčnívají, kontury jsou hladké a celkový povrch je nepoškozen.



Obr. 31 – *Sptreptomyces griseus*.

Na rozdíl od ostatních aplikovaných enzymů zde je velká pravděpodobnost, že útok byl v protisměru orientace šupinek. Lze si všimnout, jak jsou v některých místech zobrazená nepatrná odchýlení od povrchu vlněného substrátu a také malé úlomky okrajů šupinek.

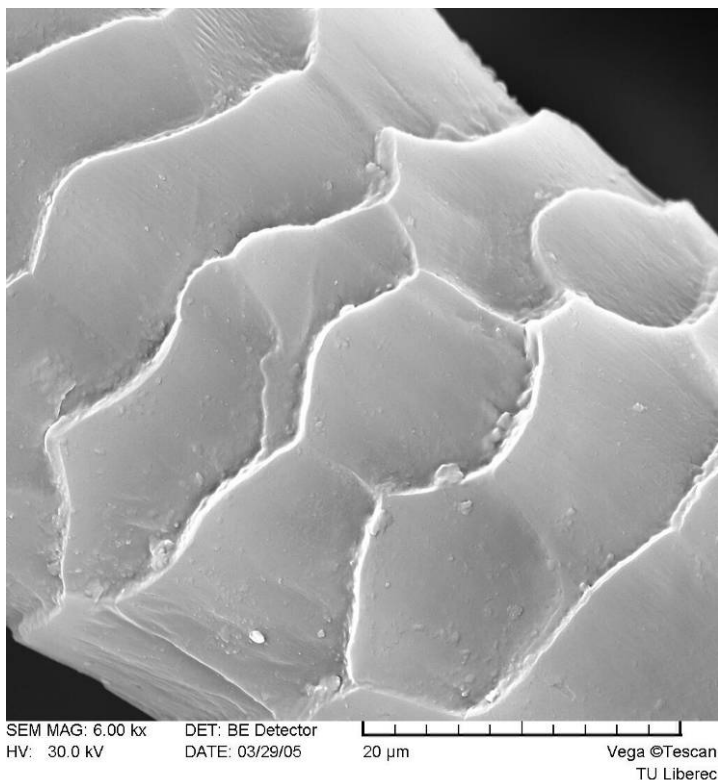


Obr. 32 – *Esterasa*.

Úprava vlněného vlákna je homogenní, šupinky jsou zaoblené a na povrchu jsou viditelné jejich úlomky.

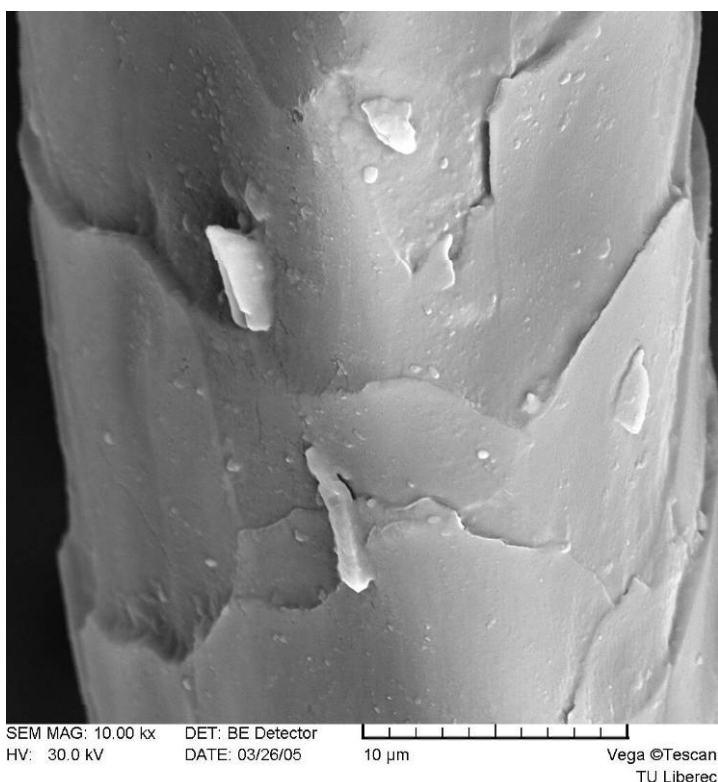
Je nutno dodat, že tento enzym štěpí pouze esterolytické vazby, které jsou především zastoupeny v cukrech. To by ovšem znamenalo, že tyto vazby mohou být přítomny ve vlněném substrátu a cílené výzkumy by mohly odhalit, zda tento předpoklad je pravdivý.





Obr. 33 – *Esteras +Bromelain*.

Tato dvojkombinace byla vybrána na základě hodnot pevností a úbytků hmotností. Jak si lze všimnout na vedlejším snímku se úprava po celém povrchu jeví jako homogenní, kde šupinky jsou rovnoměrně zaoblené a nevyčnívají.



Obr. 34 – *Esteras +Bromelain + Aspergillus saitoi*.

Tato trojkombinace byla také vybrána na základě hodnot pevností a úbytků hmotností. Celkový povrch se jeví jako hladký, šupinky jsou dobře zaoblené a jsou přítomné i jejich úlomky, které při dodatečném oplachu a praní jsou odstraněny.

## 9 Závěr

Jak již bylo řečeno v úvodu, cílem, který si kladla tato diplomové práce, bylo zkoumat změnu vlastností vlněného vlákna po enzymatické úpravě. Experimenty byly zaměřeny tak, aby se za pomoci dosažených výsledků mohlo čerpat co nejvíce informací ohledně této, možná budoucí, úpravářenské technologie.

**Prvním bodem** bylo stanovit procentualní úbytek hmotnosti vlněného substrátu po enzymatické úpravě. Přijatelný hmotnostní úbytek pro tento materiál je cca 10%. Nad tuto hodnotu se prudce k horšímu změnil, jak pevnost, tak i tažnost vláken. Na vlněném substrátu bylo celkem testováno 8 enzymů, jak samotných, tak i v kombinaci (*tab. 8, kap. 5.1* a *tab. 12, kap. 6*) a byly porovnány se vzorkem upraveným chlornanem sodným (NaClO), čili se současnou úpravářenskou technologií.

Výběr těchto enzymů byl proveden po konzultaci s enzymologem a byly vybrány enzymy, patřící do kategorie hydrolas, resp. peptidas, (*obr. 18, kap. 3.4*), které selektivně štěpí peptidické vazby v bílkovinách. Aby se tento proces mohl uskutečnit, tak je nezbytné definovat několik parametrů a to zejména: koncentraci enzymu, *pH* aplikační lázně, inkubační čas a teplotu a neméně podstatnou cirkulaci lázně. Tyto parametry mohou být libovolně nastavitelné, avšak musí se brát zřetel na tzv. operační podmínky každého enzymu a to proto, aby se využila jeho maximální aktivita. Má – li být efektivně štěpená bílkovina na protein, potom pochopitelně z hlediska konformace aminokyselinových řetězců je optimální zvolit *pH* isoelektrického bodu. U vlny se *pI* pohybuje mezi 4,3 – 5. Toto *pH* však není pro většinu testovaných enzymů optimální. Pouze pro *Aspergillus saitoi*, který byl testován, je toto prostředí akceptovatelné (pracuje se při *pH* = 4,5). Ztráta na hmotnosti se proto také jevila jako největší (až 9,11 %). Obecně lze říci, že aktivita enzymů, jejichž *pH* leží mezi 7 až 8 se při *pH* = 5 redukuje přibližně o 50 až 75%. V praxi to znamená: buď zvýšit koncentraci použitých enzymů a nebo prodloužit inkubační dobu. Tyto aspekty by měly být testovány v dalších studiích.

Důležitým parametrem je také míra penetrace enzymů do vlněného vlákna, resp. do její externí vrstvy, čili do kutikuly (epi-, eso-, endo-, viz. *kap. 1.1*) a to je samostatná kapitola dalšího výzkumu. Výsledky předložené v této diplomové práci však jednoznačně ukazují, že k této penetraci formou difúze došlo. Enzym částečně a aktivně štěpí lysinové vazby a pomocí rozvolnění povrchové bariéry vniká do hlubších vrstev vlákna a dále využívá submikroskopických ruptur povrchových vrstev.

Hodnoty úbytků hmotností dokazují nejen, že enzymy efektivně a především selektivně atakují bílkovinu keratin, ale také udávají, jak je který enzym účinnější při stejných operačních podmínkách. I přesto, že známe molekulární strukturu daného enzymu, nelze bohužel stanovit, zda bude aktivní vůči danému substrátu nebo nikoli. V tomto experimentu se osvědčily zejména bakteriální enzymy z *Bacillus polymyxa*, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus saitoi* a enzym  $\alpha$  – chymotrypsin, které způsobily na vlněném materiálu více než 8 % váhové ztráty. Nižší úbytky od 4 do 7 % byly způsobeny trypsinem, esterazou a směsí pankreatických enzymů. Pro velmi šetrnou úpravu mohou doporučit enzym bromelain (< 4%).

**Druhým bodem** této diplomové práce bylo studium změn mechanických vlastností: *pevnost – tažnost* před a po enzymatické úpravě. Obecně vzato se předpokládá, že dojde – li ke ztrátě hmotnosti daného materiálu, musí této ztrátě odpovídat nižší hodnoty pevnosti a tažnosti. Oproti očekávání tento předpoklad nenastal, nýbrž se projevil opačný jev (viz. Tab. 10, kap 5.2). Příčina tohoto jevu není doposud známa a musí být hnacím motorem podrobnějšího výzkumu. Lze pouze předpokládat, dle známých teoretických poznatků, že heterolytické štěpené vazby mezi jednotlivými  $\alpha$  – aminokyselinami se částečně přeformovaly do jiných vazeb a v prostoru zaujímaly jinou pozici. Tou hlavní příčinou zvýšené hodnoty pevnosti a tažnosti vůči standardu (neupravená vlna), je však přeskupení početných intra a intermolekulárních vazeb, které úzce souvisí se změnou sekvencí  $\alpha$  – aminokyselin v jednotlivých řetězcích. Najde – li se chemický mechanismus, který vše řídí, pak bude možno obdržet úpravu vlněného materiálu dle účelu použití. Druhou možností pro vysvětlení tohoto zajímavého jevu, může být přítomnost elastinových vláken (ve velmi malém množství), které se pravděpodobně nacházejí ve vnitřní struktuře vlněného vlákna. K těmto (zatím plně neověřeným) teoriím nás vedou pokračující výzkumy.

**Třetí bod** byl zaměřen na studium kombinací některých enzymů. Tyto kombinace byly stanoveny dle výsledků z úbytků hmotnosti a ze studia pevnosti a tažnosti. Experimenty prokázaly, že v praxi nemá význam používat vyšší kombinace enzymů než enzymy dva. Optimální kombinací, která se nám ověřila a byla studována, je Bromelain + Esterasa a *Bacillus polymyxa* +  $\alpha$  – chymotrypsin. Cílem kombinací je využít vlastnosti více enzymů, ale pozor – ne najednou. Před úpravou se musí stanovit přesná hierarchie, poněvadž ve společně lázni by si tyto enzymy konkurovaly o aktivní místa, jinak řečeno, nevyužily by se potenciály jednotlivých enzymů. A proč dva a ne

více enzymů? Odpověď je velmi jednoduchá. Třetí enzym by ve své podstatě neměl kam útočit, byl by inertní vůči substrátu a tudíž neefektivní. Tento efekt byl potvrzen výsledkem trojkombinace, která byla sestavena takto: *bromelain* + *esterasa* + *Aspergillus saitoi*. Ukázalo se, že poslední enzym způsobil na vlněném materiálu pouze 0,89% úbytku hmotnosti, přičemž na neupravený vzorek tento enzym byl cca 10x účinnější.

Hodnoty pevnosti a tažnosti ve výše zmíněných kombinacích se nějak markantně nelišily od vzorků upravených jedním enzymem. Ve všech případech byla pevnost vyšší než u standardu (viz. *Grafy 8 – 10, kap 6*) o cca 2 cN/tex, avšak zaznamenal se pokles tažnosti o cca 4%.

**Čtvrtý bod** byl zaměřen na analýzu post – reakčních reziduí. Pro tento výzkum se zvolila I.R. spektroskopie, oblast středních vln (M.I.R.). Bohužel tato volba nebyla šťastná, poněvadž metoda se nejevila dosti citlivá. Doporučuje se elektroforéza a především klasická kolonová chromatografie. Lze pouze konstatovat na základě tenkovrstevné chromatografie (*obr. 23 – 25, kap. 5.4.*), že v post – reakčních reziduích byly přítomné jak samotné aminokyseliny, tak i vyšší organické struktury. Tím jsou myšleny dipeptidy, tripeptidy atd. Budou –li zkoumány tyto post – reakční rezidue, pak bude možno lépe pochopit morfologické změny vlněného vlákna především v oblasti kutikuly (šupinky). Z těchto výsledků lze pak zjistit, do jaké míry vlněný substrát byl atakován a *změněn* enzymem.

**Posledním bodem** bylo zkoumat omak jednotlivých enzymaticky upravených vzorků. Jak již bylo řečeno v *kap.5.4* tento vjem je zcela subjektivním vjemem a těžko ho lze zobjektizovat. Výsledky předložené v této diplomové práci v *tab.15* dokázaly, že některé enzymaticky upravené vzorky zaznamenaly jemnější omak vůči standardu (neupravený vzorek, pouze praný neionogenním tenzidem). Lze si také všimnout, že se omak nejen lišil podle typu použitého enzymu, ale také podle inkubačního času. U všech zkoušených enzymů, kromě u  $\alpha$  –chymotrypsinu, se s rostoucím časem zhoršil omak. Opak je u vzorků upravených klasickou chlornanovou technologií. Zde větší čas napomáhal k získání jemnějšího omaku.

Další zajímavost, která byla pozorována při hodnocení omaku, potvrdila, že ženské a mužské citění jsou si velmi odlišná, ba skoro opačná. Důvod nelze pouze vyhledat v odlišné psychice, ale také v odlišné fyziologii prstu . Bylo totiž vědecky dokázáno, že cití prstu je zapříčiněno tzv. Meissnerovými tělísky [26], jejichž počet je vyšší u žen než u mužů.

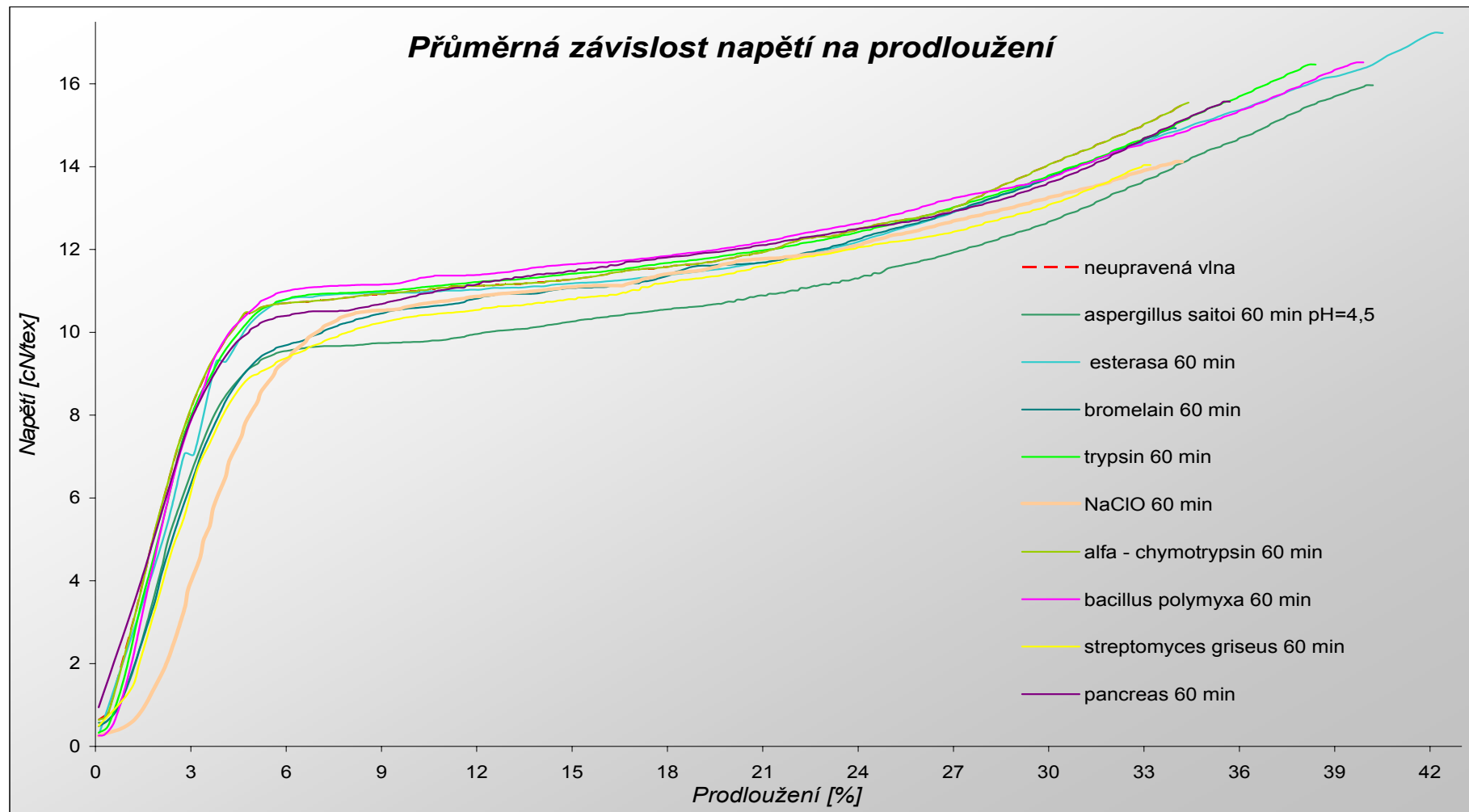
Předložená diplomová práce je dle dostupné literatury první soustavnější studií využitelnosti enzymů k technologickému zušlechťování vlastností vlny. **Práce přináší optimistický závěr, že enzymů a jejich kombinací lze použít k ekologicky výhodnému a ekonomicky únosnému zušlechťování vlny.**

## **BIBLIOGRAFIE**

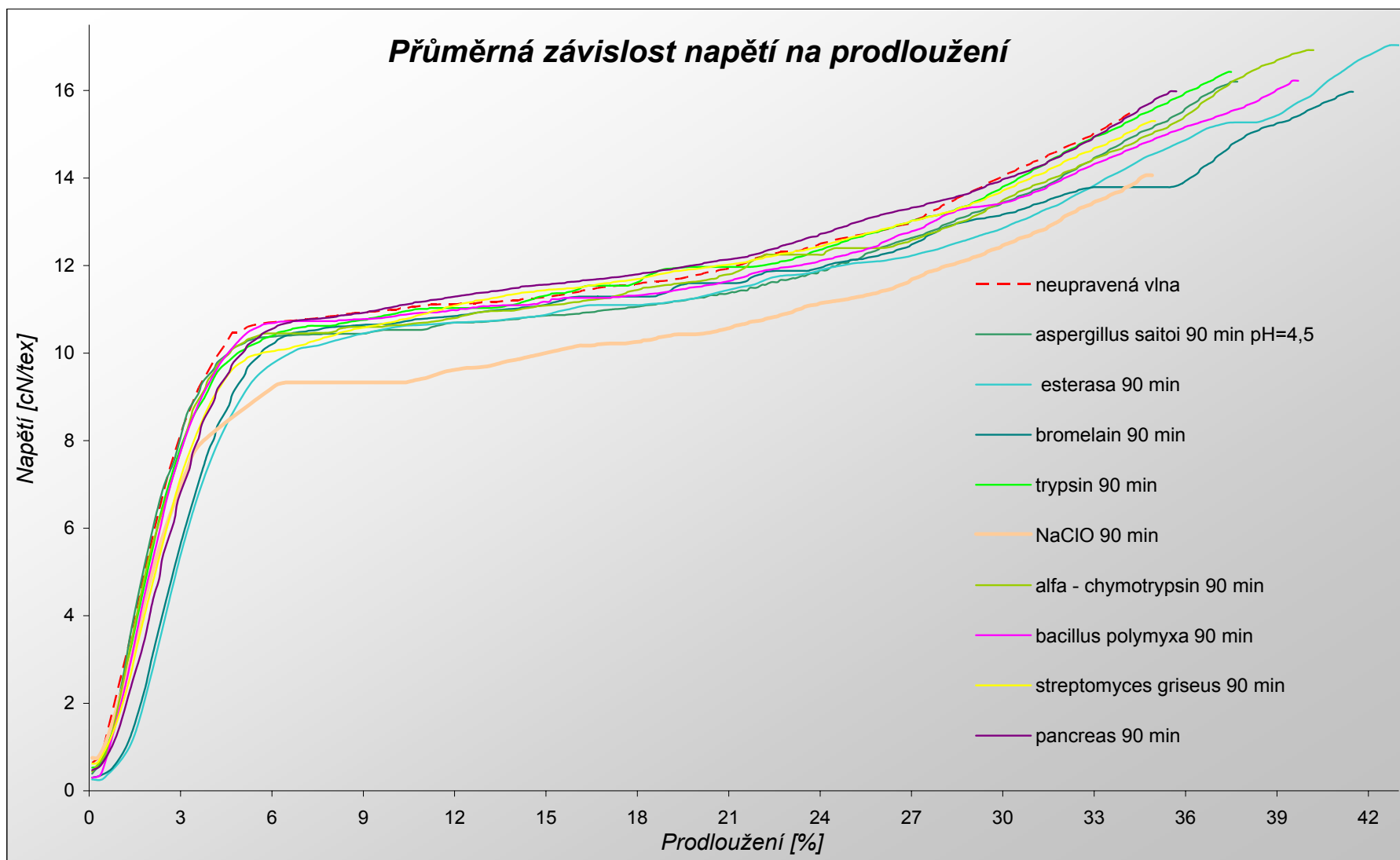
- [1] FELIX V.: *Chemická technologie textilní*, Praha 1952
- [2] BONA M.: *Introduzione al finissaggio laniero*, Paravia, Torino 1995.
- [3] VODRAŽKA Z.: *Biochemie 1*, VŠCHT Praha 1992.
- [4] MORRISON R.T., BOYD R.N.: *Chimica organica*, 5 vyd. Milano: C.E.A. Casa Editrice Ambrosiana, 1991
- [5] MILITKÝ J.: *Textilní vlákna*, TUL, Liberec 2002.
- [6] CORBANI F.: *Nobilitazioni dei tessili*, Milano 1990
- [7] RŮŽIČKA J.: *Technologie předúprav, finálních a speciálních úprav textilních materiálů*, VŠCHT, Pardubice 1985
- [8] RIVA A., CEGARRA J., PRIETO R.: *The role of an enzyme in reducing wool shrinkage*, JSDC Volume 109 May/June 1993.
- [9] CNR – ISMC: *Valorizzazione di lane autoctone piemontesi per la produzione di articoli tipici*, by:  
[http://www.regione.piemonte.it/agri/ita/news/public/quaderni/num39/dwd/32\\_35\\_39.pdf](http://www.regione.piemonte.it/agri/ita/news/public/quaderni/num39/dwd/32_35_39.pdf)
- [10] VODRAŽKA Z.: *Enzymologie*, VŠCHT, Praha 1998.
- [11] *Enzimi come catalizzatori biologici*  
<http://www.med.unibs.it/~marchesi/enzimologia/enzimi1.html>
- [12] HRČKOVÁ M., ŠTURDÍK E., MALIAR T., ZEMANOVIČ J.: *Biochemické vlastnosti proteolytických enzymů*, Chem.Listy 98, 842 – 850 (2004)
- [13] MOSS G.P.: *Enzyme nomenclature*, by:  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- [14] *MEROPS the peptidase database*, by: <http://merops.sanger.ac.uk/>
- [15] *BRENDA the comprehensive Enzyme Information System*, by:  
<http://www.brenda.uni-koeln.de/index.php4?back=1>
- [16] *UNIPROT the universal protein knowledgebase*, by: [www.ebi.uniprot.org](http://www.ebi.uniprot.org)
- [17] SEGER J., HINDLS R.: *Statistické metody v tržním hospodářství*, Praha 1995

- [18] GRALINSKY M.: *Chemicko – technické textilní rozbory*, SNTL – nakladatelství technické literatury, Praha 1967.
- [19] KUSTER F.W., THIEL A.: *Chemicko analytické výpočetní tabulky*, Academia, Praha 1988.
- [20] ČSN 80 0200
- [21] ČSN 80 0240
- [22] GASPARIČ J., CHURÁČEK J.: *Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin*, SNTL - nakladatelství technické literatury, Praha 1981.
- [23] COZZI R., PROTTI P., RUARO T.: *Analisi chimica strumentale metodi ottici*, volume B, 2 vyd. Zanichelli, Milano 2001.
- [24] SOCRATES G.: *Infrared and Raman characteristic group frequencies* (table and charts).
- [25] KŘEMENÁKOVÁ D., MILITKÝ J.: *Techniky řízení jakosti s aplikací v textilu*, TUL, Liberec 2000.
- [26] *Fisiologia del tatto*: [http://etd.adm.unipi.it/theses/available/etd-10112003-111852/unrestricted/02\\_1\\_Fisiologia\\_del\\_Tatto.pdf](http://etd.adm.unipi.it/theses/available/etd-10112003-111852/unrestricted/02_1_Fisiologia_del_Tatto.pdf).

## PŘÍLOHA

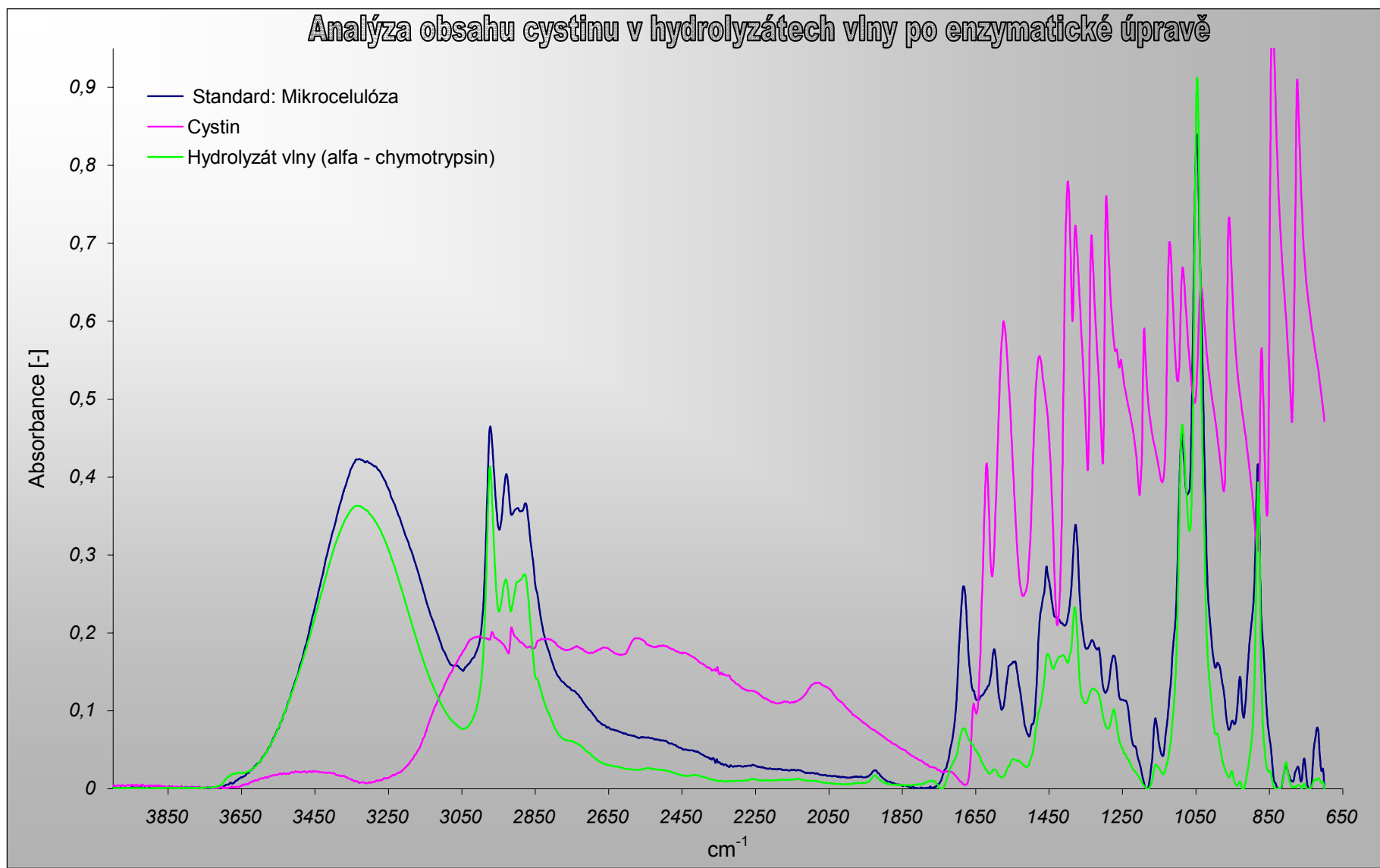


Graf. 14 – pracovní diagram vlněných vláken, které byly podrobeny enzymatické a chlornanové úpravě (teoretický odkaz v kap. 1.3.1.1.).

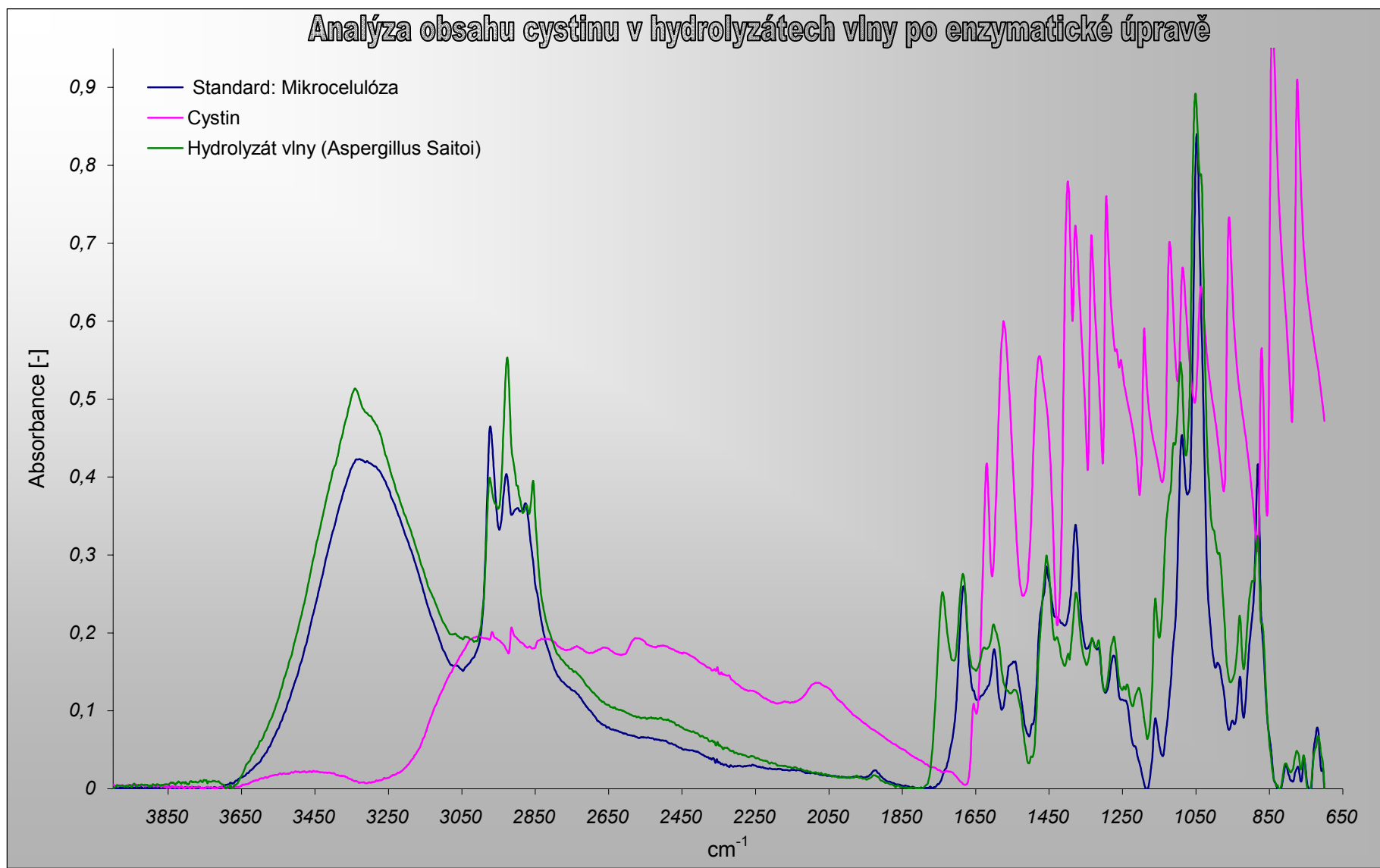


Graf. 15 – pracovní diagram vlněných vláken, které byly podrobeny enzymatické a chlornanové úpravě (teoretický odkaz v kap. 1.3.1.1.).

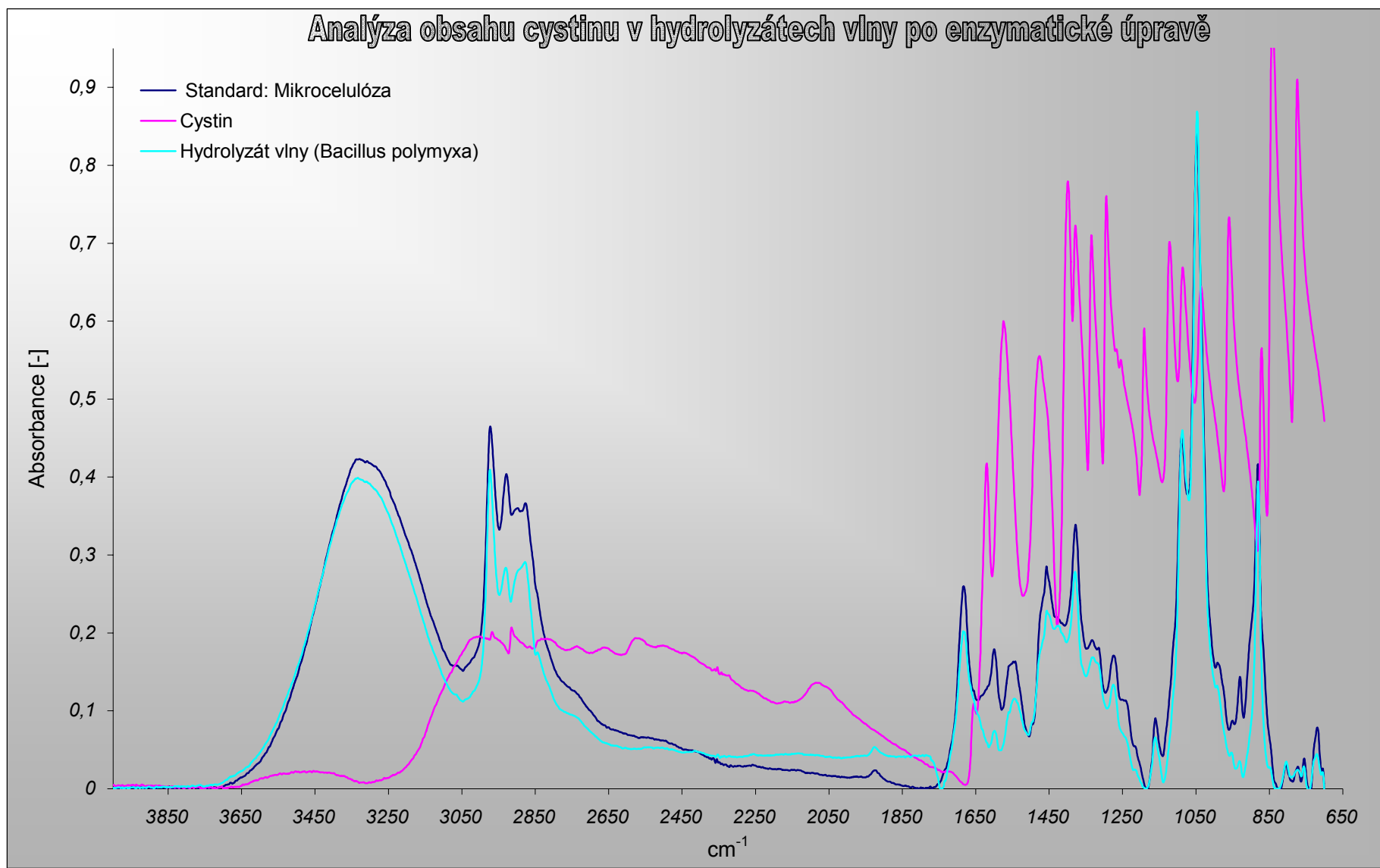




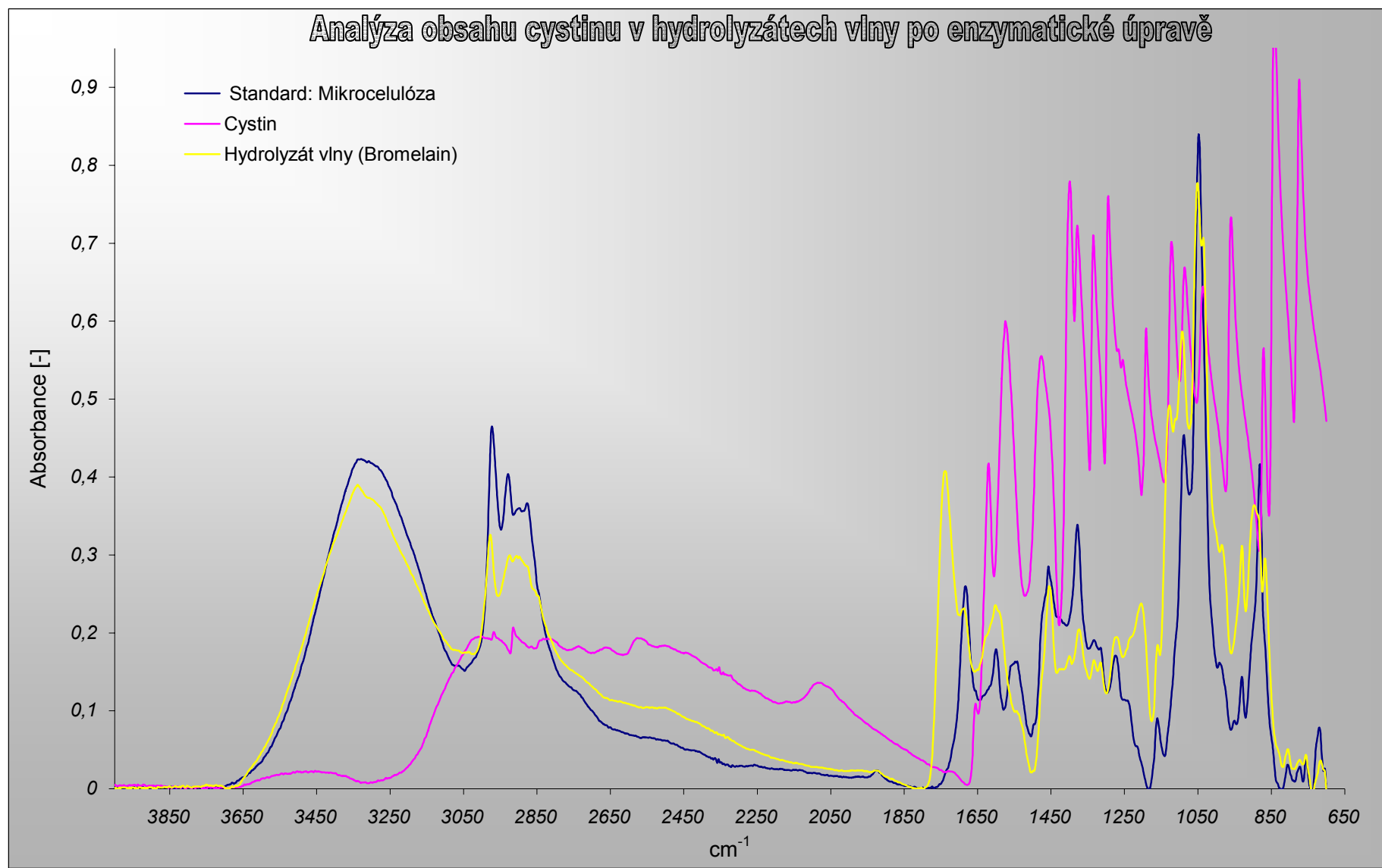
Graf. – 16. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po úpravě  $\alpha$ -chymotrypsinem



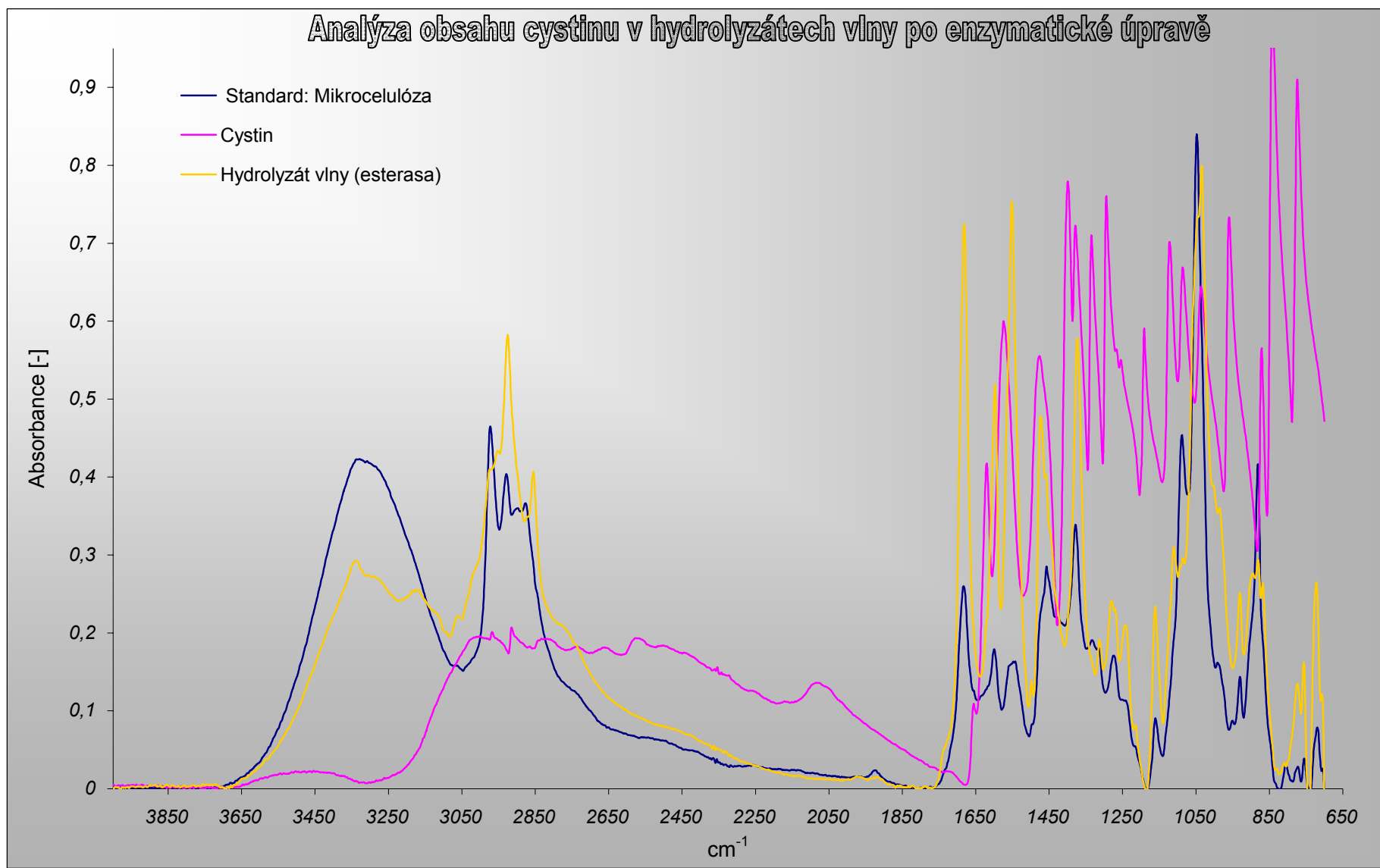
Graf. – 17. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystallickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po úpravě *Aspergillus*em



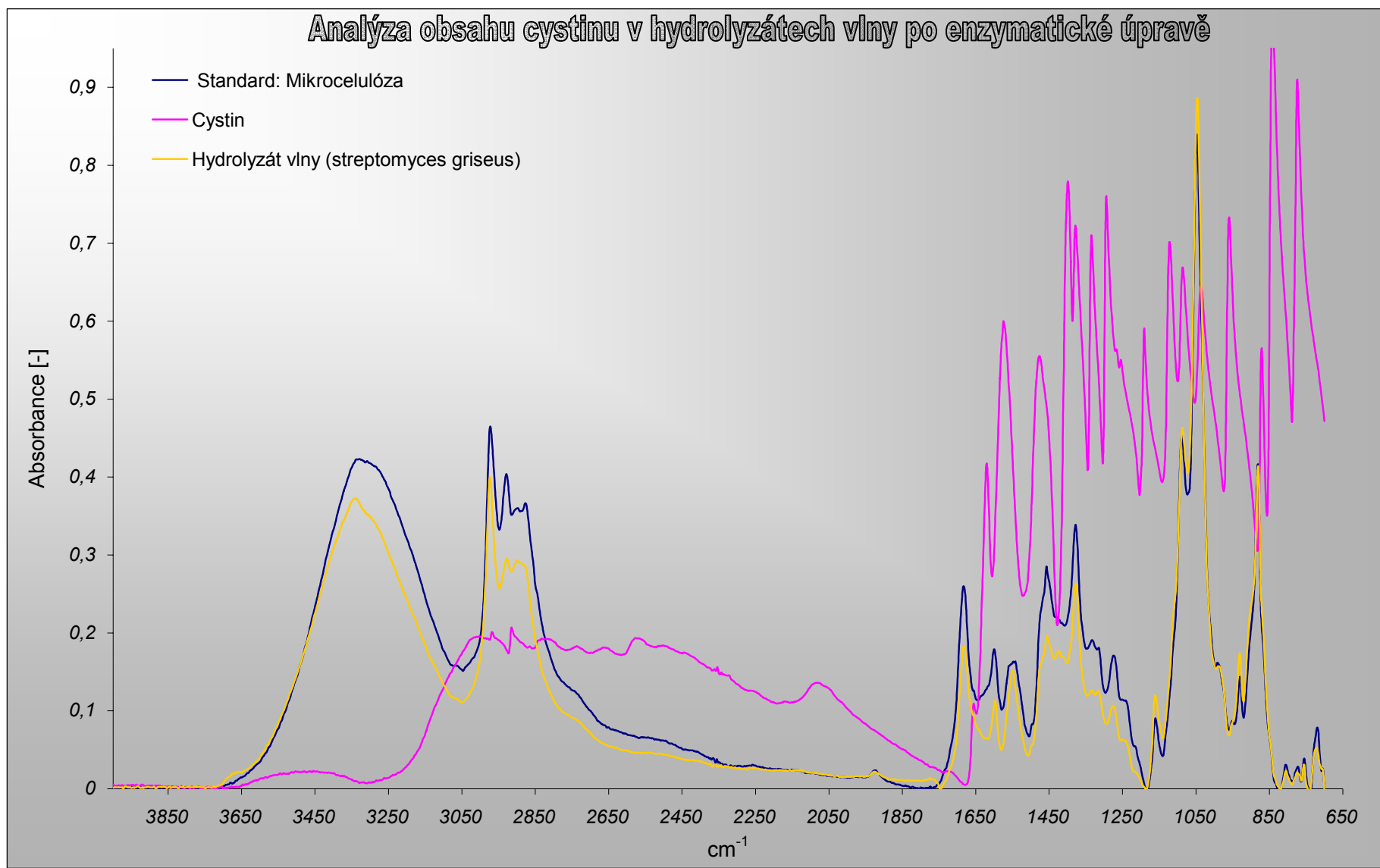
Graf. – 18. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystallickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po úpravě bacilem polymyxem



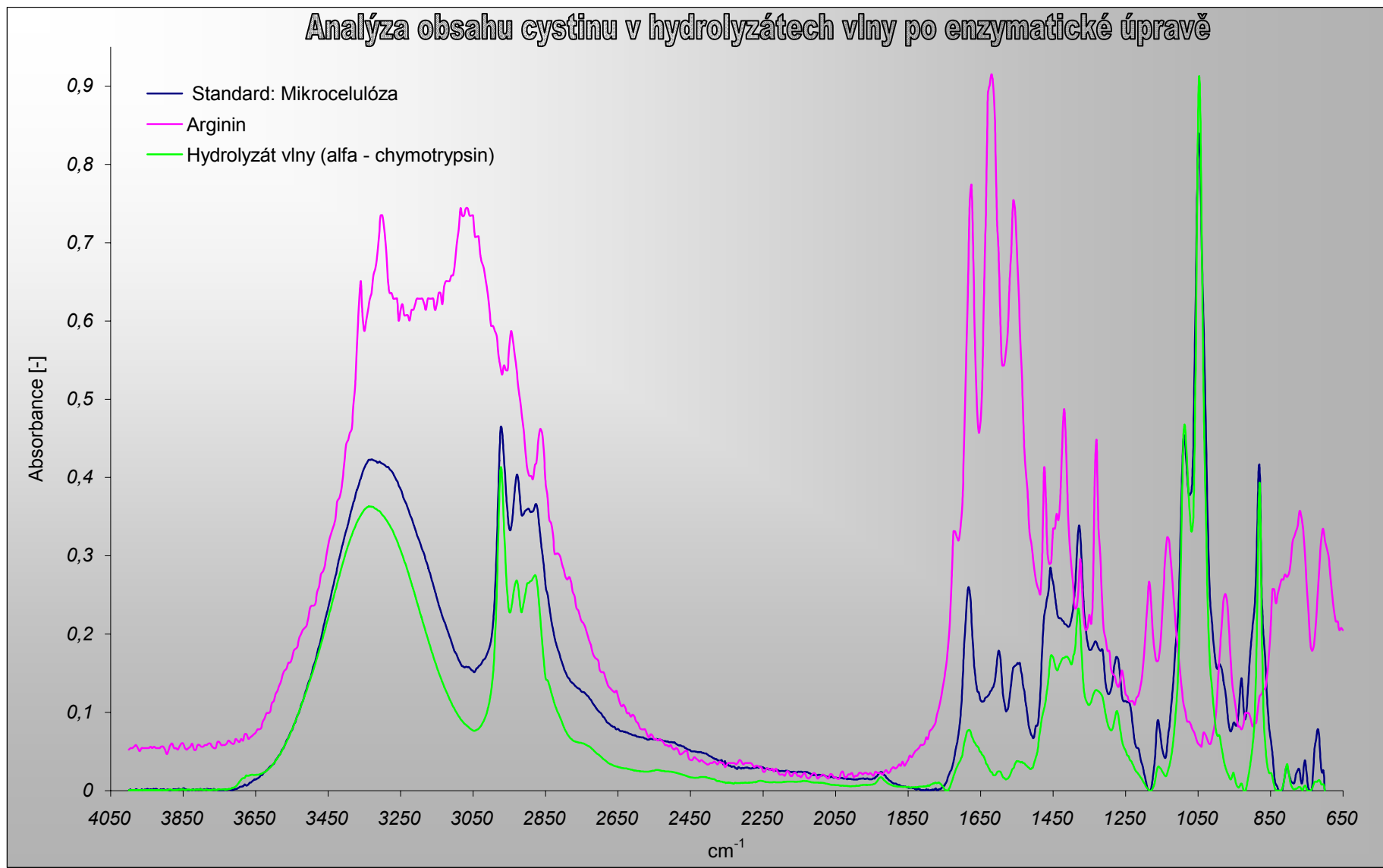
Graf. – 19. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrytalickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po úpravě Bromelainem



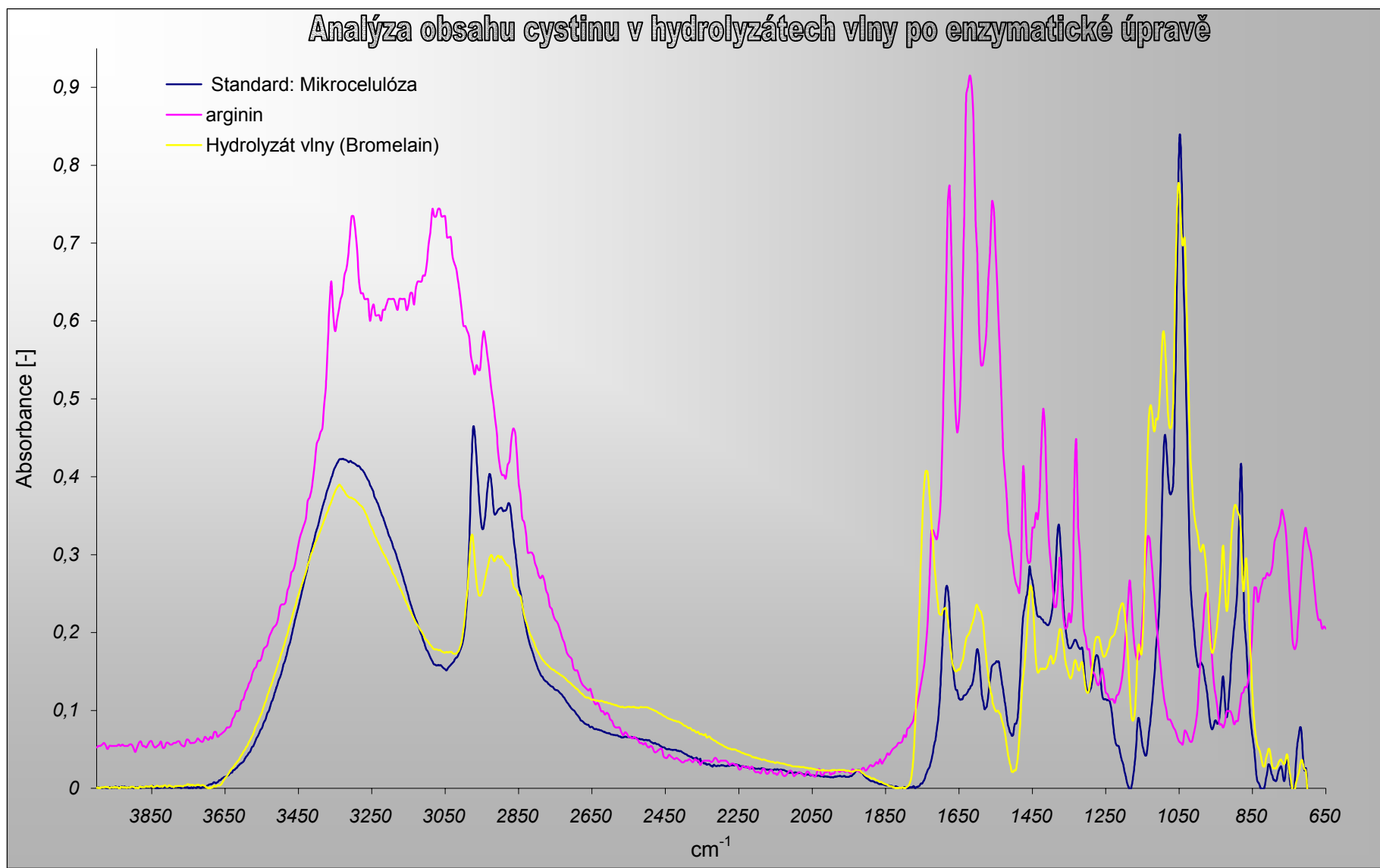
Graf. – 20. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po úpravě Esterasou



Graf. – 21. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý cystin a hydrolyzát vlny po úpravě *Streptomycesem*

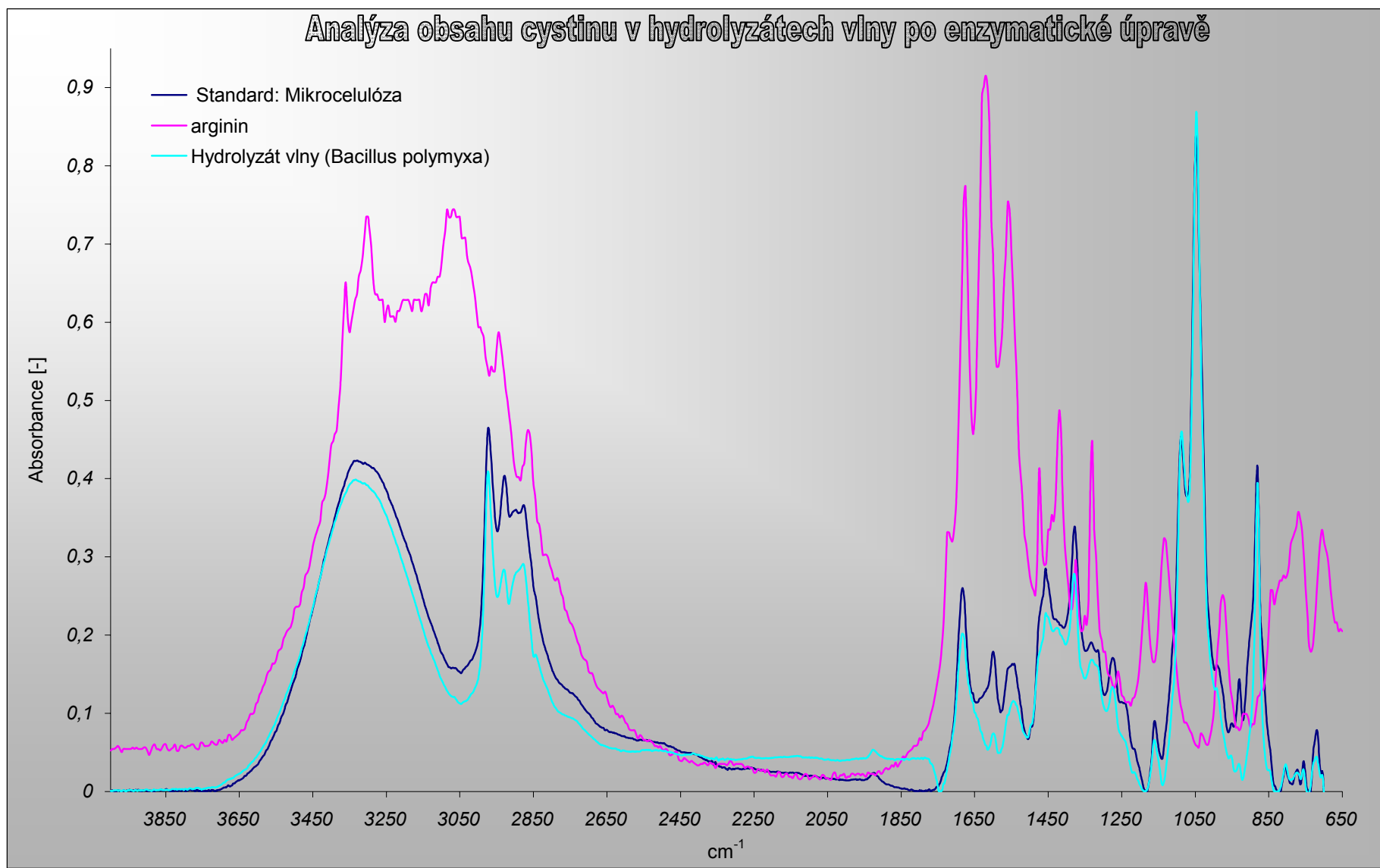


Graf. – 22. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý arginin a hydrolyzát vlny po úpravě  $\alpha$  – chymotrypsinem.

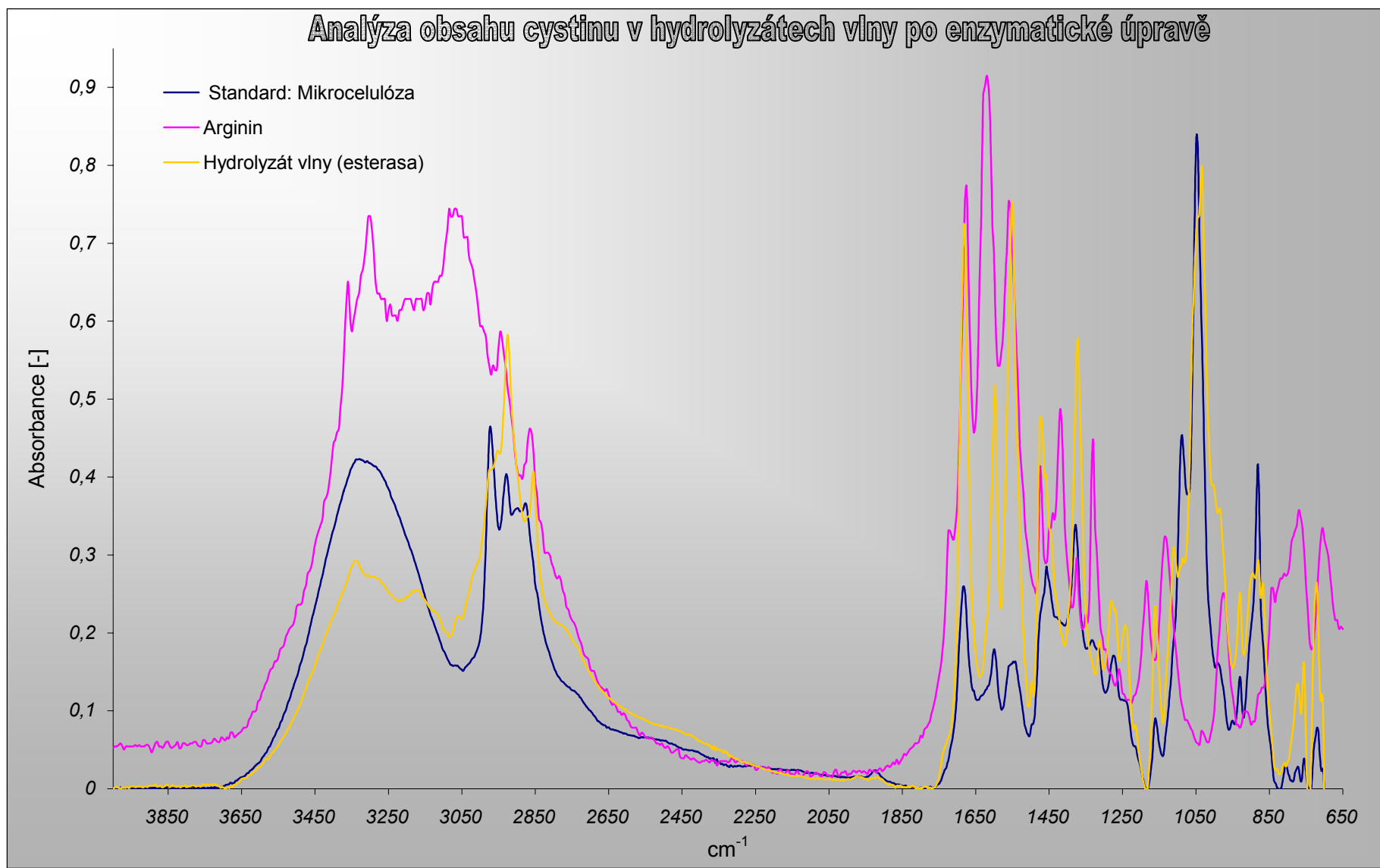


Graf. – 23. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý arginin a hydrolyzát vlny po úpravě Bromelainem.

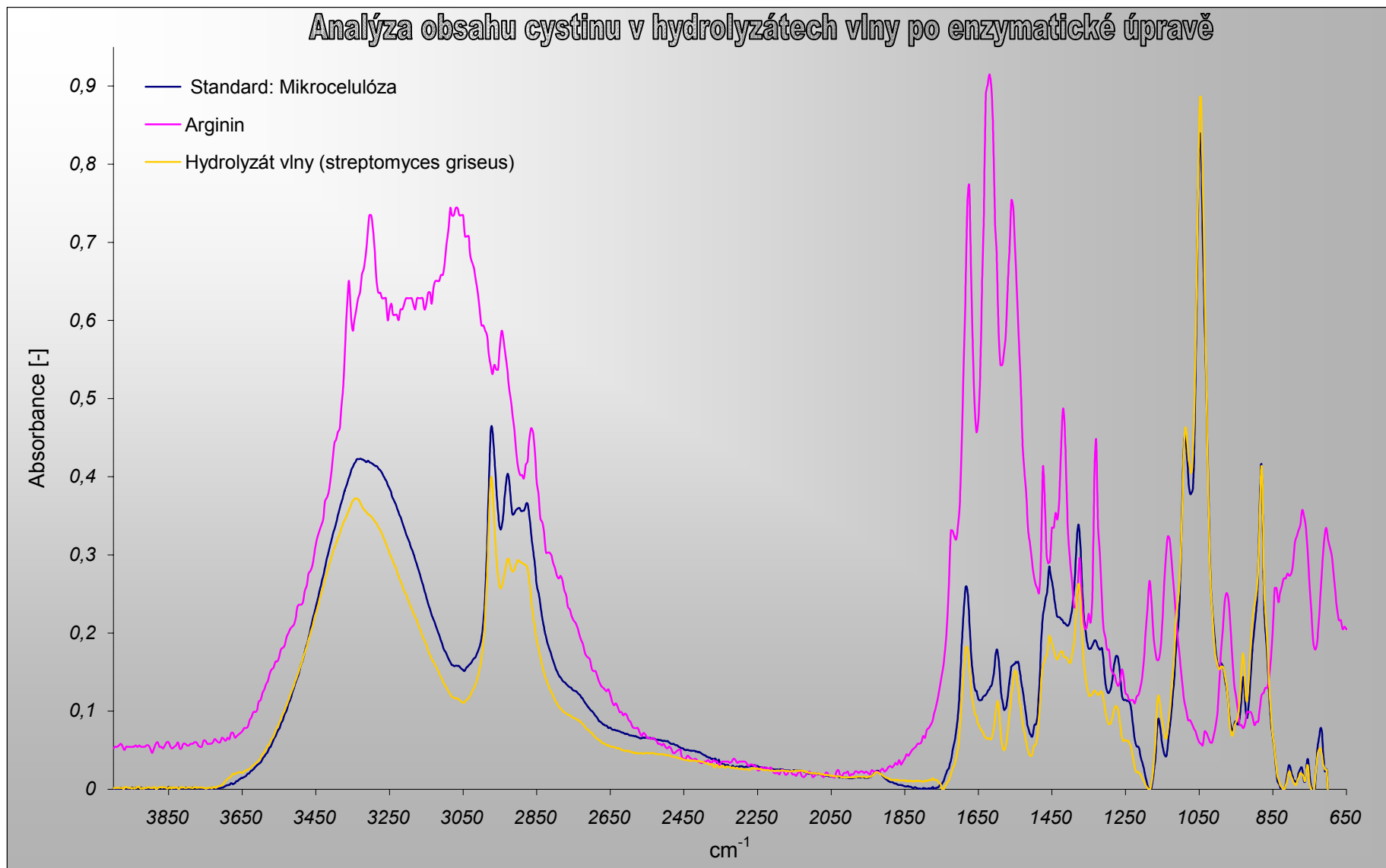




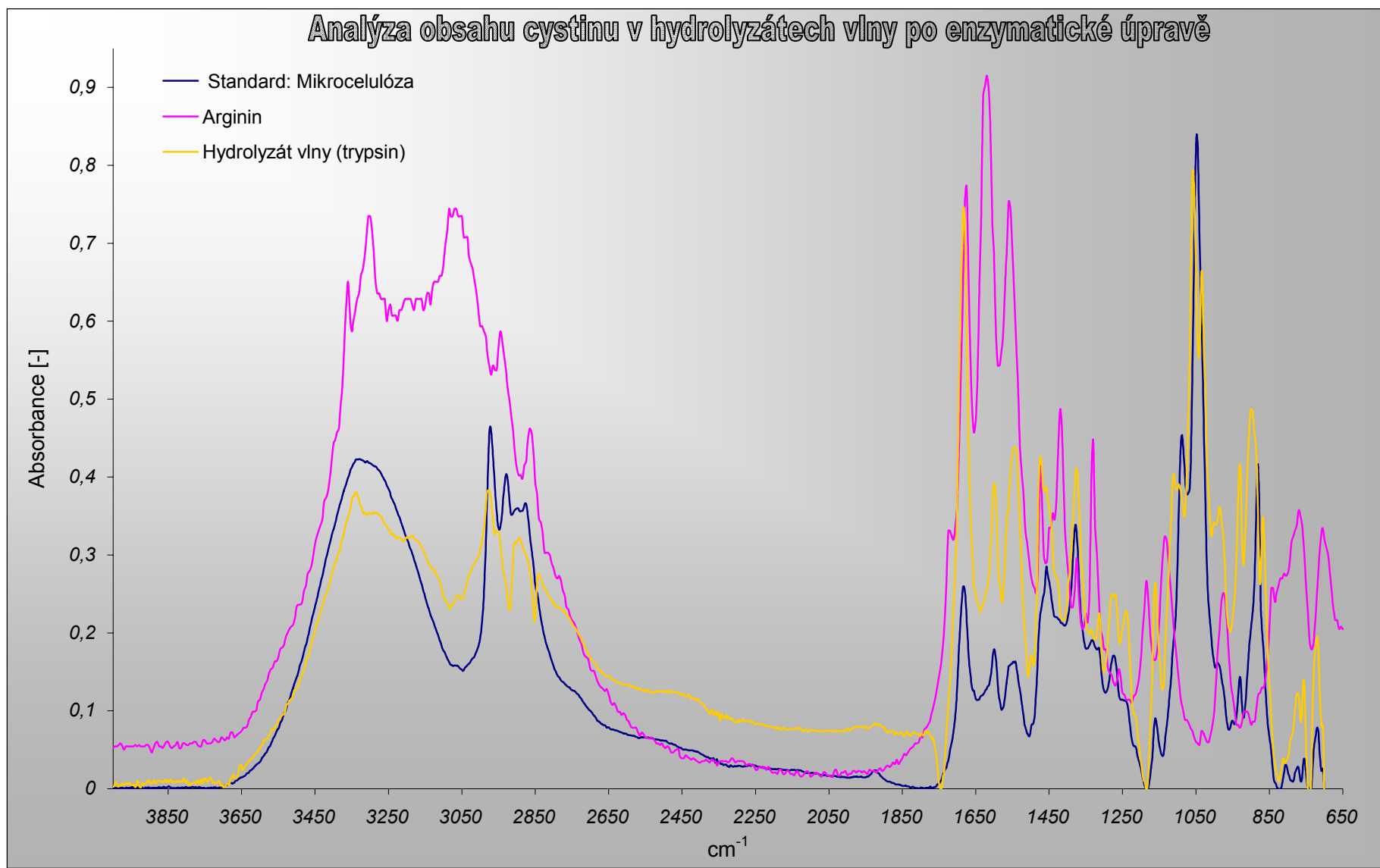
Graf. – 24. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý arginin a hydrolyzát vlny po úpravě *Bacillusem polymyxem*.



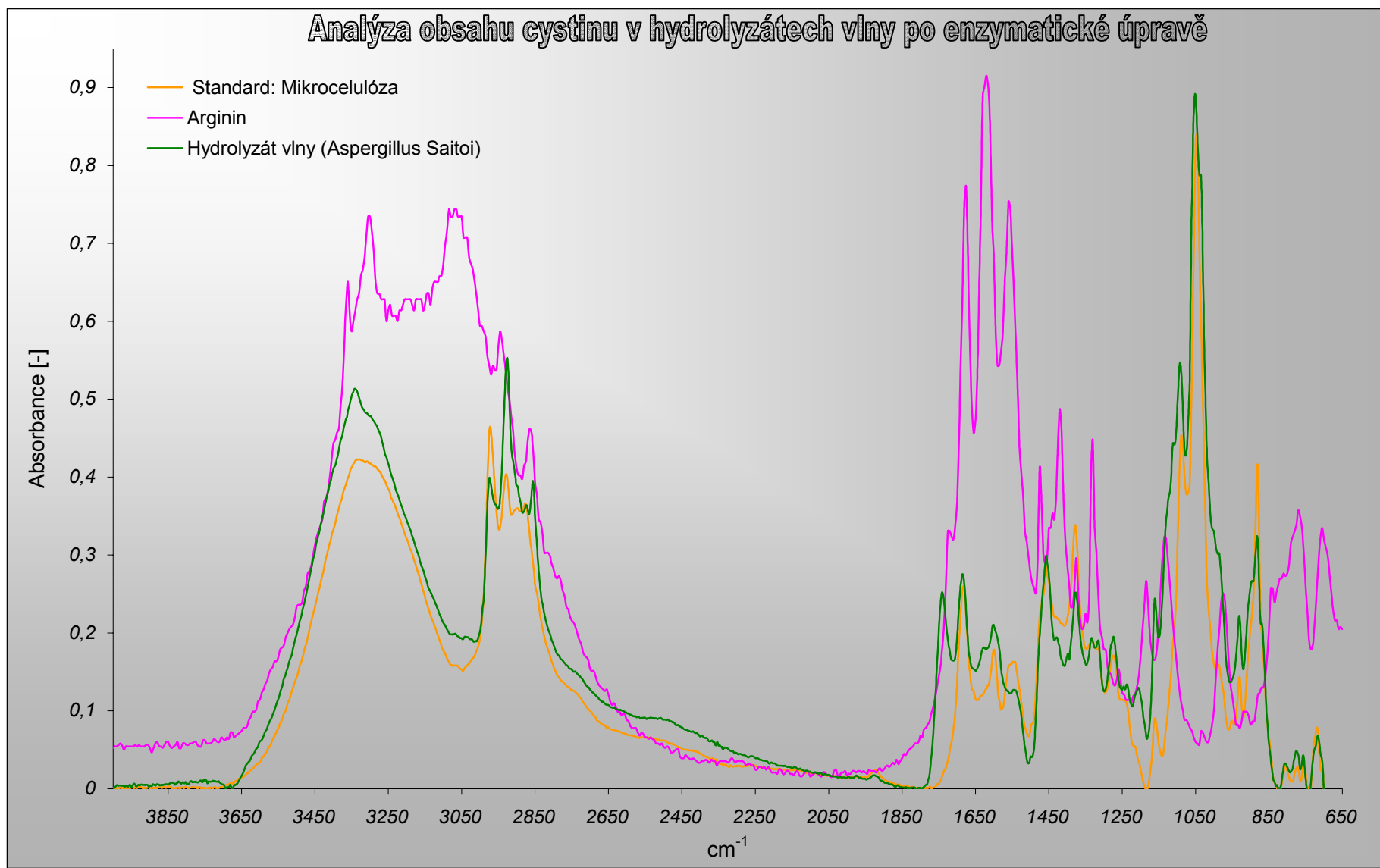
Graf. – 25. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý arginin a hydrolyzát vlny po úpravě Esterasou



Graf. – 26. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý arginin a hydrolyzát vlny po úpravě *Streptomycesem*.



Graf. – 27. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý arginin a hydrolyzát vlny po úpravě Trypsinem.



Graf. – 28. M.I.R. spektra zobrazující mikrokrystalickou celulózu, čistý arginin a hydrolyzát vlny po úpravě *Aspergillus*em.